

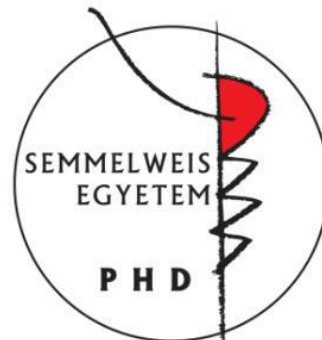
A májfibrosis mérés invazív és non-invazív módszereinek összehasonlító elemzése különböző etiológiájú májbetegségekben

Doktori értekezés

Dr. Horváth Tünde

Semmelweis Egyetem

Patológiai Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Schaff Zsuzsa akadémikus, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szende Béla MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Székely György PhD osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Veres Gábor MTA doktora egyetemi
docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lengyel Gabriella DSC egyetemi docens
Dr. Simon Károly PhD ny. osztályvezető
főorvos

Budapest

2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	5
1.1. A chronicus májbetegségek etiológiai háttere.....	7
1.1.1. <i>Alkohol abusus</i>	7
1.1.2 <i>Vírus hepatitisek</i>	8
1.1.2.1. Hepatitis B vírusfertőzés (HBV)	8
1.1.2.2. Hepatitis C vírusfertőzés (HCV)	9
1.1.3. <i>Autoimmun eredetű chronicus májbetegségek</i>	11
1.1.3.1. Autoimmun hepatitis (AIH)	11
1.1.3.2. Autoimmun eredetű cholestaticus májbetegségek.....	12
1.1.4. <i>Metabolikus betegségek</i>	14
1.1.4.1. Nem alkoholos zsírmáj / steatohepatitis (NAFLD/NASH)	14
1.1.4.2. Haemochromatosis	15
1.1.4.3. Wilson-kór.....	16
1.2. Fibrogenesis	16
1.3. A fibrosis diagnosztikája.....	18
1.3.1. <i>Májbiopszia</i>	18
1.3.1.1. Digitális patológia - morphometriai analysis	19
1.3.2. <i>Szérum markerek</i>	20
1.3.2.1. Direkt markerek.....	20
1.3.2.2. Indirekt markerek	22
1.3.2.3. Kombinált markerek.....	25
1.3.3. <i>Képalkotó/scanning technikák</i>	26
1.4. A microRNS molekulacsalád	29
2. Célkitűzések	34
3. Módszerek	35

3.1. Betegek.....	35
3.2. Metszetkészítés	37
3.3. Tranziens elasztográfia (Fibroscan)	38
3.4. Digitális morphometriai analysis	40
3.5. Biokémiai vizsgálatok	42
3.6. RNS izolálás.....	42
3.7.Reverz transzkripció (RT) és kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)	42
3.9. Statisztikai analysis	43
4. Eredmények	44
4.1 A digitális morphometriai vizsgálat eredményei.....	44
4.2. MicroRNS vizsgálat eredményei	47
5. Megbeszélés.....	56
5.1. A digitális morphometriai mérések értékelése	56
5.2. A miR vizsgálatok eredményeinek értékelése.....	58
6. Következtetések	62
7. Összefoglalás	64
7. Summary	65
Irodalomjegyzék	66
Saját publikációk jegyzéke	83
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke:.....	83
Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények	83
Köszönetnyilvánítás	85

Rövidítések jegyzéke

AIH, autoimmun hepatitis	JNK, c-jun N terminal kináz
AFP, alfa fötoprotein	LKM1; mikrosomalis antitest
ALD; alcoholic liver disease (alkoholos májbetegség)	LS, liver stiffness (máj keménység)
ALT, alanin aminotranszferáz	miR; microRNS
ANA; antinuclearis antitest	MMP, mátrix metalloproteináz
AP1; aktivátor protein1	NAFLD, non- alcoholic fatty liver disease (nem alkoholos zsírmáj)
APRI; AST-to-Platelet Ratio Index (AST vérlemezke hányados index)	NASH, non- alcoholic steatohepatitis (nem alkoholos steatohepatitis)
AST, aszpartát aminotranszferáz	NFκB, nuclear factor kappa B
CAH; chronicus aktív hepatitis	PBC, primer biliaris cirrhosis
CHC, chronikus C hepatitis	PSC, primer sclerotisalo cholangitis
CPH, chronicus perzisztáló hepatitis	TE, transiens elasztográfia
CTGF; connective tissue growth factor (kötőszöveti növekedési faktor)	TGF-β, transforming growth factor- β (transzformáló növekedési faktor-β)
DMA, digitális morphometriai analysis	PDGF, platelet-derived growth factor (vérlemezke-eredetű növekedési factor)
ECM, extracellularis mátrix	PTEN; phosphatase and tensin homolog
EMT, epithelialis-mesenchymalis transitio	TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase (szöveti metalloproteináz inhibitor)
HA; hyaluronsav	ROS, reaktív oxigén gyök
HBsAg; hepatitis B surface (felszíni) antigén	SMA, simaizom ellenes antitest
HBV, hepatitis B vírus	
HCC, hepatocellularis carcinoma	
HCV, hepatitis C vírus	
HSC, hepatic stellate cell (csillag sejt)	

1. Bevezetés

A chronicus májbetegségek nemcsak hazánkban, de világszerte is egyre jelentősebb népegészségügyi problémát jelentenek. A WHO 2014-ben publikált adatai szerint Magyarországon a májcirrhosis okozta halálozási arány 27,21/100.000 fő. Ezzel az „előkelő” 36. helyen állunk a világ vizsgált 172 országa közül (<http://www.worldlifeexpectancy.com/cause-of-death/liver-disease/by-country/>). Ugyancsak a WHO adatai szerint 2012.-ben 3.900 ember haláláért volt felelős a májcirrhosis (ez az összes halálozás 3%-a), mely így a hetedik leggyakoribb halálok volt Magyarországon (http://www.who.int/gho/countries/hun/country_profiles/en/).

Az idült májbetegségek kialakulásában számos etiológiai tényező szerepelhet (vírus, autoimmun betegség, metabolikus zavar, toxikus ágens, genetikai rendellenesség stb). A betegség a legtöbb esetben tünetmentesen, vagy tüneteizényen zajlik, így az gyakran csak előrehaladott állapotban kerül diagnosztizálásra. Az etiológiától függetlenül a chronicus májbetegségek lefolyásában közös, hogy a májban valamilyen szintű gyulladásos folyamat zajlik, melyet idővel kötőszövet szaporulat - fibrosis - majd szerkezeti torzulás és átépülés - cirrhosis - követ. A cirrhotikus májban nagy valószínűséggel alakul ki hepatocellularis carcinoma (HCC) melynek incidenciája 3-5% évente. (Fares és Peron 2013). Az idült májbetegség korai felismerése alapvető jelentőségű a beteg és a társadalom szempontjából is. Az egyén számára a felismerés és az eredményes kezelés az egészség, a munkaképesség, az életminőség megőrzését jelenti, míg a közösség szempontjából a fertőzés terjedésének a megállítását, a későbbi súlyos szövődmények (májzsugor és következményei: varix vérzés, vascularis és parenchymás decompensatio stb) megelőzését, és így jelentős egészségügyi költségmegtakarítást eredményezhet.

Az idült, diffúz májbetegségek esetében a lefolyás, a prognózis megítéléséhez, a terápia módjának megválasztásához, valamint a terápia hatékonyságának megítéléséhez az egyik legfontosabb információ a betegség stádiumának felmérése, a fibrosis jelenlétének, illetve mértékének megállapítása, változásának követése. Napjainkban ez talán legmarkánsabban a chronicus vírushepatitisek – elsősorban a chronicus C hepatitis

(CHC) – terápiájában a legaktuálisabb (van der Meer és mtsai. 2012, Horvath és mtsai. 2015).

A fibrosis diagnosztikájának alapja („gold standard”) az elmúlt mintegy 50 évben a májbiopszia volt. Invazivitása, a mintavételi hiba, az egyes vizsgálók értékelése közötti eltérések („intra,- és interobserver error”) problémája miatt újabban sokan megkérdőjelezik a biopszia végzésének szükségességét a chronicus májbetegségek mindennapi diagnosztikájában.(Afdhal 2004) Ugyanakkor vitathatatlan előnye, hogy a biopszia során nyert mintából számos molekuláris, immunhisztokémiai vizsgálat is elvégezhető és a fibrosis kvantitatív mérésére is lehetőség nyílik, digitális morphometriai analysissal (DMA).

A fenti okok miatt, az utóbbi években a fibrosis meghatározására irányuló non-invazív diagnosztikus technikák jelentős mértékben fejlődtek. Ezek egyrészt vérből kimutatható markerek, vagy ezek kombinációi – mint például az APRI (*AST-to-Platelet Ratio Index*) -, másrészt képkalkotó és scanning technikák (pl. Transiens Elastographia - Fibroscan). Ezen módszerek egyértelmű értéke, pontossága jelenleg is megbeszélés tárgya a nemzetközi irodalomban. (Poynard 2011)

Jelen munkánk egyik célja az volt, hogy különböző kórokú májbetegségekben vizsgáljuk a májfibrosis pontos meghatározásának lehetőségeit, és összevessük az invazív és non-invazív technikák használhatóságát.

Számos májbetegségben a microRNS-ek (miR) - ezen kicsiny, nem-kódoló, a génexpressziót általában negatívan szabályozó RNS molekulák - jellegzetes változása mutatható ki.(Yuan 2013, Wei 2013, Ogawa 2012) Felvetődik, hogy a fibrosis során is változik expressziós szintjük, mely a fibrosis mértékét és az esetleges progressziót jelezheti. Mindezek alapján, arra kerestük a választ, hogy a miR expresszió változásának nyomon követésével növelhető-e a kórszövettani fibrosis mértéke meghatározásának pontossága.

1.1. A chronicus májbetegségek etiológiai háttere

A chronicus májbetegségek hátterében számos kiváltó ok állhat, ezek közül is a leggyakoribbak: az alkohol abusus, a vírushepatitisek (hepatitis B, hepatitis C), autoimmun betegségek (autoimmun hepatitis, primer biliaris cirrhosis, primer sclerosáló cholangitis), metabolikus betegségek, (nem alkoholos zsírmáj, Wilson kór, haemochromatosis), valamint a tartósan fennálló toxikus, és -gyógyszer ártalmak. Ritkábban előforduló kórképekhez tartoznak a fejlődési rendellenességek, genetikai megbetegedések, enzimopathiák, melyek már gyermekkorban, vagy fiatal felnőttkorban súlyos tüneteket okozhatnak.

Továbbiakban a chronicus májbetegségekért leginkább felelős etiológia tényezőket részletezzük.

1.1.1. Alkohol abusus

Az alkohol mértéktelen fogyasztása okozta egészségkárosodás világszerte hatalmas problémát jelent. A májban a szerv elzsírosodását, gyulladást, fibrosist okoz, majd cirrhosishoz és HCC-hoz vezethet.

Az alkohol dehydrogenáz enzim működése révén bomlik az alkohol és az így keletkezett acetaldehyd fokozza a transzformáló növekedési faktor (TGF β 1) szekrécióját és indukálja a TGF β II.-es típusú receptorok megjelenését a máj csillagsejtjein, melyek kulcsfontosságúak a kollagén lerakódás szempontjából. A TGF β 1 az alkoholos steatosis és steatohepatitis kialakulásában is szerepet játszik. (Mormone és mtsai. 2011).

Az alkohol metabolizmusa során reaktív oxigén gyökök (ROS) is keletkeznek, melyek felelősek a nagyfokú sejtpusztulás előidézéséért (Parola és Robino 2001).

A tartós alkoholfogyasztás ezen túlmenően a microsomalis enzimrendszer P4502 E1 (CYP2E1) indukcióját is előidézi, mely karcinogén metabolitok képződését serkenti. Az alkohol okozta májkárosodás leggyakoribb formája az alkoholos zsírmáj, mely a

chronicus alkoholisták mintegy 90%-ában jelentkezik (Lonovics és mtsai. 2003, Xu és mtsai. 2014). Lokalizációja eleinte centrolobuláris, majd az egész lebenyre kiterjedhet. A fibrosis megjelenésére jellemző, hogy kezdetben perivenularisan, majd perisinusoidalisan és pericellularisan látható. Amennyiben a folyamathoz gyulladás is társul, szabálytalan hegesedések, a májsejtekben jellegzetes hyalin zárványok (Mallory-testek) jelennek meg és a szerkezet átépülésével szabálytalan nodulusok (általában micronodulusok) képződésével kialakul a cirrhosis (Kopper és Schaff 2004, Torok 2015).

1.1.2 Vírus hepatitisek

1.1.2.1. Hepatitis B vírusfertőzés (HBV)

A chronicus hepatitis B vírusfertőzés globális közegészségügyi probléma. Világszerte kb. 400 millióra tehető a fertőzöttek száma, Magyarországon a HBV fertőzöttek arányát 0,5-0,7%-ra becsülik. Kezelés nélkül az esetek 15-40%-ában fejlődik ki májcirrhosis és/vagy hepatocelluláris carcinoma (McMahon 2005).

Az akut HBV fertőzés felnőttek esetében több mint 95%-ban 6 hónap alatt meggyógyul, chronicus fertőzés csak kevesebb, mint 5%-ban alakul ki. Az újszülöttkori fertőzés csaknem minden esetben chronicussá válik (Horváth 2008).

A HBV a *Hepadna* víruscsalád tagja, kettős szálú DNS vírus. Az emberi szervezetbe parenterálisan jut. A vírus indirekt citotoxicitás révén CD8+ T sejteken keresztül okozza a májsejtek elhalását. Képes integrálódni a gazdaszervezet DNS-ébe, mint mutagén ágens kromoszómális átrendeződést okoz, és fokozza a genom instabilitását (Mormone és mtsai. 2011). Az ún. HBx protein képes a hepatocytákban közvetlenül is indukálni a TGF- β termelést és parakrin módon aktiválni a csillagsejteket (Baranova és mtsai. 2011). Morfológiailag a nekroinflammáció, valamint a hepatocyták cytolasmájában megjelenő ún. tejüveg-szerű átalakulás jellemző (**1/a ábra**). A HBsAg immunhisztokémiai reakcióval, vagy Shikata-féle orcein festéssel is kimutatható (Kopper és Schaff 2004).

1.1.2.2. Hepatitis C vírusfertőzés (HCV)

A hepatitis C vírus felfedezése 1989-re tehető, amikor igazolták, hogy a vírus RNS genommal rendelkezik és bebizonyosodott, hogy a Flavivírusok, ezen belül a Hepacivírus genusba sorolható (Schaff és mtsai. 2015, Webster és mtsai. 2015). A betegséget okozó fertőző ágens felismerése azonban korábban kezdődött. 1979-ben akut és chronicus hepatitisben szenvedő betegek szérumát csimpánzokba vitték át és igazolták, hogy a betegséget fertőző, átvihető ágens okozza. Sem a hepatitises betegek szérumában, sem az inokulált állatokban nem sikerült azonban sem az A-, sem a B-hepatitis vírus markereit kimutatni, ezért a fertőzést non-A non-B-hepatitisnek, a kórokozót non-A non-B-ágensnek nevezték el (Alter és mtsai. 1978). A továbbiakban állatkísérletek sora és részletes elektronmikroszkópos vizsgálatok igazolták, hogy a fertőzés hatására az állatokban jellegzetes endoplazmatikus retikulum eltérések és cytoplazmatikus membrán hálózathoz álló „zárvány” mutatkozik, mely feltehetően a vírus szaporodásának a helye (Schaff és mtsai. 1984, Schaff és mtsai. 1986, Schaff és mtsai. 2015).

Az egyes virális antigének megismerése alapján a vírus replikáció egyes lépései is ismertté váltak, melynek alapján új irányú, molekuláris célterápia vált lehetővé. Immun-elektronmikroszkópos vizsgálatok igazolták, hogy a HCV core komponense a lipidekkel igen szoros kapcsolatban áll, mely magyarázatot adott arra, hogy miért észlelhető gyakran steatosis a HCV fertőzések során (Barba és mtsai. 1997, Schaff és mtsai. 2015). Ezen vizsgálatok azt is igazolták, hogy a core komponensnek valószínűleg szerepe van a HCV onkogén hatásában (Barba és mtsai. 1997, Schaff és mtsai. 2015).

A HCV fertőzés első lépése a vírus részecskének a hepatocytákhoz való kötődése. Ez több sejtfelszíni receptor közreműködésével valósul meg, melyek a tight junction fehérjék (claudin-1, occludin), a scavenger receptor B1 (SRB1) és a CD81. A további lépések során egy 10 domént tartalmazó polyprotein termelődik a virális RNS-templátról az endoplazmatikus retikulumban, melyek közül 3 struktúrális fehérje (C, E1, E2) (Evans és mtsai. 2007, Schaff és mtsai. 2015), és 7 enzim sajátosságokkal bíró, nem struktúrális fehérje (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). Az utóbbiak közé proteázok és az RNS-függő RNS polimeráz tartoznak. A polypeptidet részben a

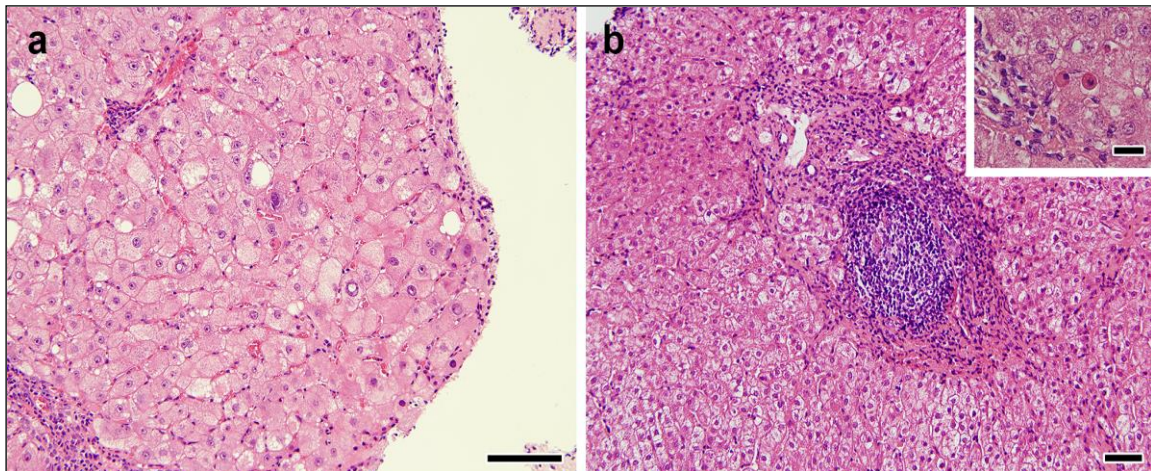
gazdasejt, részben a virális proteázok kaszkád-szerűen egymásra épülve hasítják aktív fehérjékre (Schaff és mtsai. 2015).

A világon megközelítőleg 170 millió embert érint a hepatitis C vírusfertőzés (Lim és mtsai. 2014). Magyarországon HCV antitest pozitívak aránya 0,7%, közülük megközelítőleg 50000-re becsülhető azok száma, akik biztosan fertőzőképesek, azaz HCV-RNS- pozitívak (Hunyady 2007). A HBV-sal ellentétben a HCV ellen nem rendelkezünk hatékony védőoltással. Bár az akut fertőződés általában enyhe, jelentőségét mégis az adja, hogy az esetek 70-80%-ában a betegség chronicussá válik.

Az átvitel a HBV-hoz hasonlóan elsősorban parenterálisan (leginkább fertőzött vérkészítmények útján) történik, de mintegy 30%-ban a pontos fertőződési mód nem ismert.

Az akut hepatitis C histologiai képe nem különbözik lényegesen egyéb hepatotrop vírus (A, B) okozta akut hepatitis képétől. Jellegzetes portalis, acinaris gyulladás, apoptotikus testek, makrofág aktivitás megfigyelhető, mint a gazdaszervezet védekező mechanizmusa, többnyire azonban viszonylag enyhe formában. A vírus-specifikus T-sejtek a fertőzött hepatocyták apoptosist indukálják, melyben egyes antivirális citokineknek és a „halál”- receptorok, így a Fas ligand/CD95, a tumor necrosis faktornak, stb. fontos szerepe van (Szabo és mtsai. 2003). A chronicus C hepatitis hystologiai képe sem különbözik alapvetően egyéb kórokú – így a B vírus okozta, autoimmun, toxikus stb. – chronicus hepatitis képétől. Portális gyulladás, interface hepatitis, egyes sejt pusztulás (apoptosis, necrosis, necroptosis) **(1/b ábra)** is megfigyelhető a progrediáló fibrosis és aprócseppes steatosis mellett Az apoptotikus testek jól láthatók erősen eosinophil, zsugorodott testek formájában, melyeket hamarosan fagocitálják a makrofágok (Jarmay és mtsai. 2002).

A chronicus gyulladás 15-25 év alatt cirrhosis kialakulásához vezethet, és ebben a stádiumban jelentősen nő a HCC kialakulásának a kockázata is.



1. ábra Chronicus vírus hepatitisek a: A hepatocyták cytolasmájában megjelenő ún. tejüveg-szerű átalakulás jellemző a chronicus B vírus hepatitisre (méretarány 100 μm). **b:** Chronicus C vírus hepatitisben a portális lymphoid aggregátumok megjelenése jellemző (méretarány 100 μm). Inzertben az apoptotikus testek jól láthatók, erősen eosinophil, zsugorodott testek formájában (méretarány 20 μm)

1.1.3. Autoimmun eredetű chronicus májbetegségek

1.1.3.1. Autoimmun hepatitis (AIH)

Az autoimmun eredetű májgyulladások a vírus indukálta formákhoz képest jóval ritkábban fordulnak elő. Néha acut, fulmináns megjelenéssel találkozunk, de leginkább kifejezett gyulladással járó, chronicus hepatitis formájában jelentkezik.

A betegség főként fiatal nőkön fordul elő, autoantitestek jelenléte, esetleg más autoimmun kórképek társulása is megfigyelhető. Genetikai hátterére a HLAB8, DR3/DR4 haplotípus jellemző. (Lonovics és mtsai. 2003).

Három formája ismert:

I. típus ún „lupoid” forma, antinukleáris antitest (ANA), simaizom ellenes antitest (SMA) jellemzik, 70%-ban fiatal nőkön jelenik meg.

II. típus: gyermekeken fordul elő, nem ritkán fulmináns formában. Mikroszomális antitest jelenléte (LKM1) és alacsony IgA-szint jellemzi.

III. típus: erre a formára is a női predominancia jellemző és a szolubilis máj antigén elleni antitest (anti-SLA) jelenléte (Lonovics és mtsai. 2003).

Szöveti képe portális, periportális lympho-plasmocytás infiltrációval jellemezhető, gyakran a plasmasejtek dominanciájával. A necroinflammációs aktivitás általában magas, és masszív májsejt-necrosis is jelen van (Washington 2007).

A chronicus vírushepatitisekhez hasonlóan – kezelés nélkül – cirrhosis kialakulásához vezethet.

1.1.3.2. Autoimmun eredetű cholestaticus májbetegségek

Ide soroljuk a Primer biliaris cirrhosist (PBC) és a Primer sclerotizáló cholangitist (PSC).

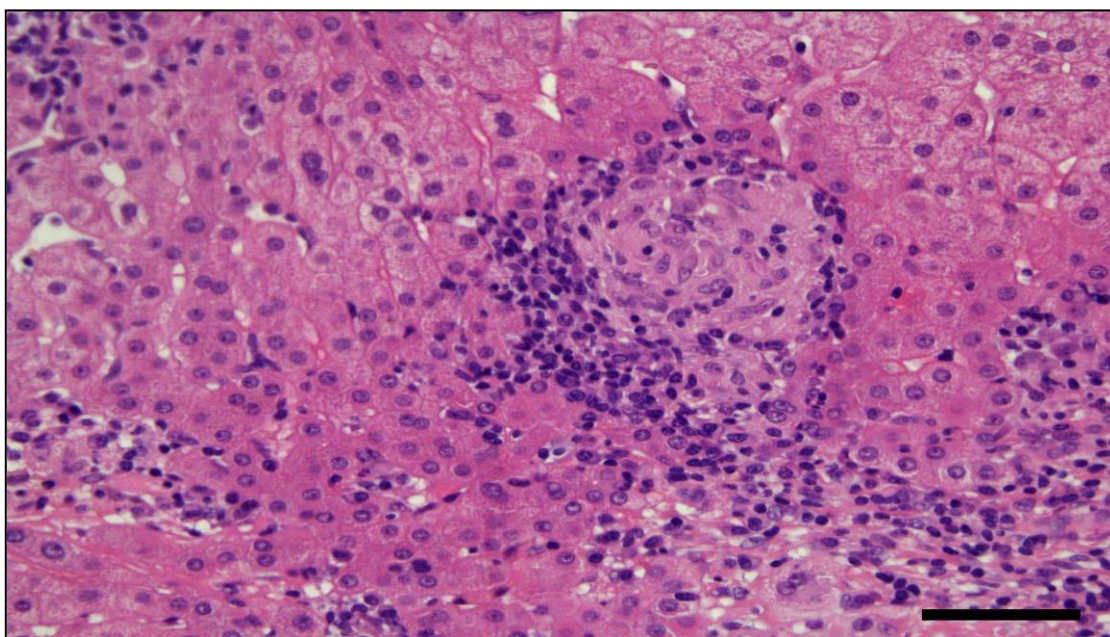
A PBC chronicus, progresszív, cholestatikus betegség, melyre jellemző a kis epeutak florid gyulladása, az ún non-suppurativ, destructiv cholangitis és a granuloma képződés.(2/a. ábra) Később inkább az epeutak proliferációja és a fokozódó septalis fibrosis jellemzi, majd kialakul a cirrhosis (Washington 2007, Reshetnyak 2015).

A PSC-re a férfi predominancia jellemző. Progresszív epeúti obliterációval, gyulladással és fibrosissal járó cholestatikus betegség. A szöveti képen a közepes és nagy epeutakat a kötőszövet „hagymalevélszerűen” veszi körül.(2/b. ábra)

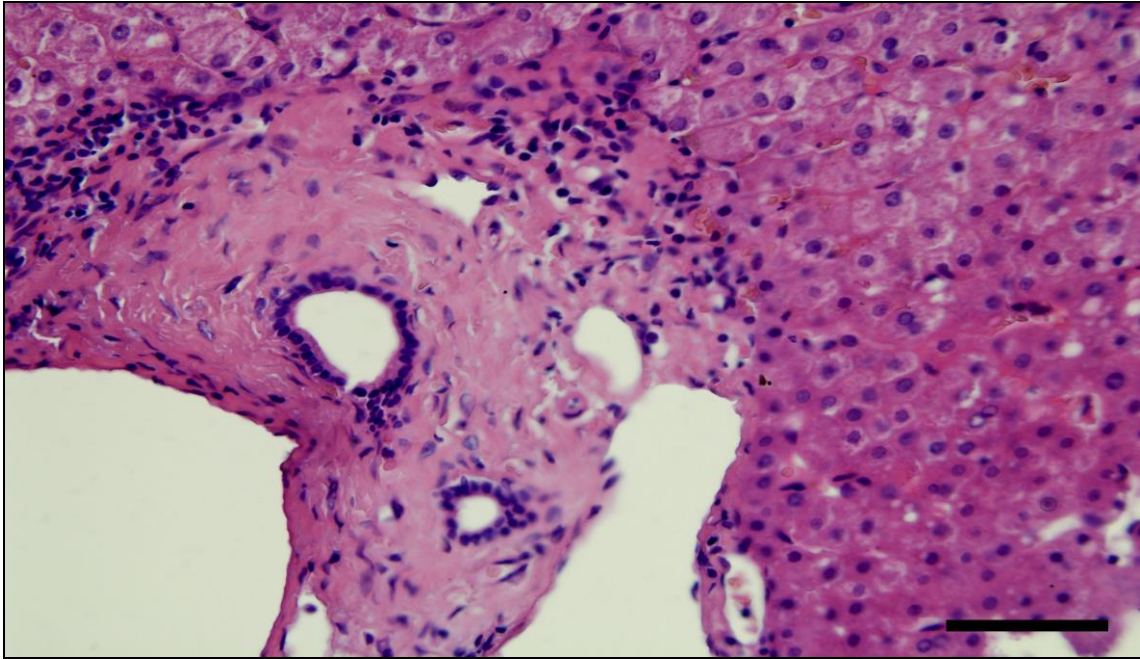
Az epeutak progresszív szűkülete mellett az epeúti hám destrukcióját is látjuk, valamint a szűkületek között tágult, cholestatikus területeket. A folyamat idővel biliaris cirrhosisba torkollik.

A PSC súlyos szövődménye az intra- és extrahepaticus cholangiocarcinoma, mellyel ebben a kórképben gyakrabban kell számolnunk, mint más idült, diffúz májbetegség esetében. Kialakulásának kockázata a betegség fennállásának az idejével szorosabb összefüggést mutat, mint a kialakult májkárosodás súlyosságával.

A cholestatikus betegségekben a proliferáló epeutak epitheliájából felszabaduló kötőszöveti növekedési faktor (CTGF), mint profibrogenetikus tényező serkenti a myofibroblastokat és a kollagén lerakódást is stimulálja. A cholestasisra adott elsődleges válasz fontos résztvevői a neutrophyl granulocyták, melyek propagációját, az oxidatív stressz váltja ki. A fibrosis a portális területeken indul, ún fibroblastban gazdag régiók létrejöttével és folyamatos myofibroblast átalakulással. A fibroblastok mellett elhelyezkedő hepatocyta réteg a korai károsodásra igen hajlamos, így a portális terek folyamatos kiszélesedése indul meg (Baranova és mtsai. 2011)



2/a. ábra. PBC-ben granuloma képződés. (méretarány 100 μ m)



2/b ábra. PSC-ben az epeutakat „hagymalevélszerűen” veszi körül a kötőszövet
(méretarány: 100 μ m)

1.1.4. Metabolikus betegségek

1.1.4.1. Nem alkoholos zsírmáj / steatohepatitis (NAFLD/NASH)

A fejlett országokban a leggyakoribb chronicus májbetegség a zsírmáj. Európában az egészséges szervdonorok 12-18%-ában találtak zsírmájat (Ratziu és mtsai. 2010). A betegség tulajdonképpen nem egy önálló kórkép, hanem egy spektrum, amely magába foglalja a zsírmájtól a steatohepatitisen (NASH) át, a cirrhosist és a hepatocellularis carcinomát is (Lewis és Mohanty 2010, Par és mtsai. 2013, Wu 2016).

Az NAFLD-t a metabolikus syndrome részjelenségeként is definálják, gyakran észlelhető mellette obesitas, 2. típusú diabetes mellitus, insulinresistencia, dyslipoproteinaemia, hyperuricaemia, hypertonia. E kórállapot elsősorban a cardiovascularis megbetegedések, szövődmények fokozott kockázatát jelenti, progresszív májkárosodás, steatohepatitis (NASH) az esetek 15-25%-ában fordul elő. Ugyanakkor újabb közleményekben arról számoltak be, hogy az ismeretlen eredetű

(cryptogén) cirrhosis talaján kialakult HCC-ák 30-40%-a társul obesitással, insulinresistenciával vagy egyéb metabolikus zavarral (Schulz és mtsai. 2015, Wu 2016).

A steatohepatitis és a fibrosis kialakulásának patomechanizmusa nem teljesen ismert. Kialakulásukban szerepet játszhat, hogy a hyperglycaemia és az insulinresistencia miatt fokozódik a szabad zsírsav szint a szérumban, emiatt a májban fokozódik a zsírraktározás, steatosis alakul ki.

A fibrogenesisben a reaktív oxigén gyökök és számos cytokin aktiváció játszik szerepet, melyek részben hepatocytá eredetűek, de fontos szerepe van, a Kupffer sejteknek, csillagsejteknek, valamint egyéb gyulladásban résztvevő sejteknek. Az oxidatív stressz és lipidperoxidáció aktiválja a csillagsejteket és TGF- β képzését indukálja.

A fibrosis ún. extrahepaticus mediátorai a bélflórából származó lipopoliszacharidák és a viscerális zsírszövet adipocytokinjei, mint a leptin. Az antiinflammatoricus hatású adiponektin szintje NASH-ban csökken (Baranova és mtsai. 2011, Par és mtsai. 2013)

A NASH morphológiájára a centrilobularisan megjelenő steatosis, a májsejtek ballonizációja, gyulladásos sejtek megjelenése és fibrosis jellemző (Brunt és mtsai. 1999).

1.1.4.2. Haemochromatosis

A haemochromatosis hereditér formája a leggyakoribb genetikai betegségek közé tartozik és a vas anyagcsere zavarában nyilvánul meg. A szervezetben fokozott a vas felszívódása, mely főként a parenchymás szervekben rakódik le, ferritin és haemosiderin formájában. Az érintett szervek: a máj, a hasnyálmirigy, a szív, a lép, a vese és a bőr, de az ízületekben, a hypophysisben is előfordul. A májban elsősorban a hepatocytákba jelenik meg a vas.

A károsodást a vassal terhelt lysosomák ruptúrája okozza, valamint szabadgyökö képződés, lipidperoxidáció, mely a csillagsejtek aktiválása révén vezet a fibrogenetikus

utak aktiválódásához és a fokozott kollagén képződéshez. Az így kialakult cirrhosisban a HCC kockázata akár 30% is lehet

Differenciál diagnosztikai szempontból fontos elkülöníteni a kóros vasfelhalmozódás sekunder okaitól pl.: chronicus anaemiák, nagy mennyiségű parenterális vaspótlás, chronicus egyéb etiológiájú (elsősorban alkoholos) májbetegség (Horvath és David 2004, Szalay 2013).

1.1.4.3. Wilson-kór

Autoszómális recesszív öröklés menetű kórkép, melyben nagy mennyiségű réz halmozódik fel a májban, az agyban és a szemben. A folyamat hátterében a 13. kromoszóma mutációja áll, így a réz nem tud kiválasztódni megfelelő mennyiségben az epével és kifejti toxicus hatását. A tünetek leginkább fiatal felnőttkorban jelentkeznek. A májban steatosis és változó súlyosságú chronicus hepatitis képe látszik. A felhalmozódott réz orcein és Rodamin festéssel mutatható ki (Kopper és Schaff 2004).

1.2.Fibrogenesis

A májfibrosis progresszív folyamatként a máj teljes átépüléséhez vezethet, mely életveszélyes szövödmények révén a beteg halálát okozhatja.

Az acut és chronicus májkárosodások a szervben fibrogenetikus faktorok aktiválódásához vezethetnek. A folyamat acut károsodáskor rendszerint reverzibilis, átmeneti, míg chronicus állapotokban a folyamat progresszív módon halad előre és cirrhosisba torkollik, mely már irreverzibilis torzulást jelenthet (Bortolotti és Guido 2007, Lee és Friedman 2011, Mormone és mtsai. 2011).

A változás érinti a máj sejtés állományát, az ECM-ot és az érrendszert is (Bortolotti és Guido 2007).

A folyamatban központi szerepet játszanak a csillagsejtek, melyek normális körülmények között a Disse térben foglalnak helyet, subendothelialisan, a májsejtek és az endothel sejtek között. Számos kapcsolattal bírnak mind az immunsejtek-, mind a hepatocyták- és az endothel sejtek felé is. Jelentős szerepet töltenek be a citokinek, a

chemokinek termelésében, és az angiogenesisben is (Lee és Friedman 2011, Mormone és mtsai. 2011).

A csillagsejtek aktiválódásuk során myofibroblast-jellegű sejtekké alakulnak, A-vitamin és retinoid tartalmukat elveszítik, nagy mennyiségben expresszálnak és secretálnak kötőszöveti elemeket (kollagéneket, elastint, strukturális glycoproteineket stb). A májkárosodás helyére a csillag sejtek mellett csontvelő eredetű myofibroblastok is vándorolnak (Gressner és mtsai. 2007). Az ECM-ban nagy mennyiségben rakódnak le magas-denzitású I-III típusú kollagének, melyek a normál májban nem jellemzőek (Bortolotti és Guido 2007).

Az ECM-ban bekövetkező kvantitatív és kvalitatív változások során, számos olyan anyag is felhalmozódik, melyek pozitív,- és negatív feedback mechanizmusok révén a csillagsejteket aktív állapotban tartják (Fowell és Iredale 2006, Bortolotti és Guido 2007).

A TGF- β -t tartják az egyik legfontosabb mediátornak a csillag sejtek aktiválásában és a matrix synthesisben (Gressner és mtsai. 2007). A TGF- β tulajdonképpen a vezető fibrogenetikus cytokin, termelésében számos sejtípus vesz részt: csillag sejtek, Kupffer sejtek, macrophagok és thrombocyták (Fowell és Iredale 2006). Ezen sejtek még számos egyéb mediátor kibocsájtásával (PDGF, ET-1, IGF-1 MCP-1) tartják fent a csillagsejt aktivációt. Számos szignáltranszdukciós út is beindul (NF- κ B, c-jun, c-myb, AP-1), melyek hatására a csillagsejt proliferál (Fowell és Iredale 2006, Gressner és mtsai. 2007).

Az aktiváció korai szakaszában egy mátrix komponens, a mátrix metalloproteináz (MMP)-1/13 expresszálódik erősen, míg az őt gátló szöveti inhibitor metalloproteináz (TIMP) pedig gyengén, később az MMP -2 és -14 a domináns, de a TIMPs 1-2 szekréciója is megnő (Fowell és Iredale 2006).

A folyamat szabályozása sokrétű, részben transzkripciós faktorok, magi receptorok, epigenetikus reguláció és a nemrégiben azonosított posttranszkripcionális szabályozókon, a mikro RNS-eken keresztül valósul meg (Lee és Friedman 2011).

A fibrogenesis és a fibrolysis ily módon dinamikusan változó folyamat. A kiváltó ágens eliminálása, illetve a különböző mediátorok és szignáltranszdukciós utak gyógyszeresen történő gátlása lehetőséget nyújthat a folyamat megállítására, illetve visszafordítására (Inagaki és mtsai. 2012). Az utóbbi időben már bizonyított, hogy a cirrhosis is reversibilis lehet (Bortolotti és Guido 2007)

Különösen fontos ezért a fibrosis stádiumainak pontos meghatározása, hogy a folyamat változásai detektálhatóak legyenek.

1.3. A fibrosis diagnosztikája

A fibrosis diagnosztikájának „gold standardja” az elmúlt évtizedekben a májbiopszia volt. Invazivitása, a sampling error, az intra,- és interobserver error kérdésköre miatt újabban sokan megkérdőjelezik rutindiagnosztikai módszerként való alkalmazását a chronicus májbetegségekben (Afdhal 2004, Baranova és mtsai. 2011).

Az utóbbi években a fibrosis kimutatására szolgáló non-invazív technikák fejlődtek, melyek egyrészt vérből kimutatható markerek, vagy ezek kombinációi, illetve a belőlük képzett indexek; másrészt képalkotó és scanning technikák, vagy ezek kombinációi.

1.3.1. Májbiopszia

A chronicus májbetegségek diagnosztikájában a biokémiai, szerológiai tesztek és képalkotó eljárások mellett, kiemelt szerepe volt az elmúlt évtizedekben a májbiopsziának. Nem csupán a fibrosis mértékéről tudunk pontos információt nyerni, hanem a gyulladás,- a necrosis jelenlétéről, annak súlyosságáról valamint pigment, és egyéb anyagok lerakódásáról is. Tájékozódhatunk az epeutak és az érrendszer esetleges károsodásairól. A histológiai kép értékelésére számos numerikus rendszert dolgoztak ki az évek során. A 60-as évek végén a chronicus hepatitiseket két nagy csoportra osztották: chronicus persistáló hepatitisre (CPH) és chronicus aktív hepatitisre (CAH) (De Groote és mtsai. 1968). A 80'-as években Knodell és mtsai dolgoztak ki egy új pontrendszert a gyulladás és a fibrosis együttes értékelésére, melyet a 90-es években többször módosítottak (Desmet és mtsai. 1994). Később kifejezetten a chronicus HCV

fertőzöttek mintáinak értékelésére jött létre a Metavir score, ami a fibrosis súlyosságát értékeli 0-4-ig (Poynard és mtsai. 1997) (**3. ábra**). Manapság a mindennapi gyakorlatban a fibrosis meghatározására és a necroinflammáció mértékének értékelésére az Ishak és mtsai által kidolgozott rendszert alkalmazzuk. Ebben a rendszerben külön értékeljük a fibrosist (0-6-ig), ez a stage, és a HAI-t (Histologiai Aktivitási Index), ez a grade, mely a necroinflammáció mértékéről ad felvilágosítást (Ishak és mtsai. 1995).

A non-invazív technikák fejlődésével, főként a tranziens elasztográfia (Fibroscan) térhódítása miatt, a napi gyakorlatban az összevethetőség kedvéért a Metavir score-t is alkalmazzuk nemcsak chronicus vírus hepatitisekben, de egyéb etiológiájú májbetegségekben is (pl PBC, PSC) (Corpechot és mtsai. 2006).

A májbiopszia további előnyei, hogy a bioptátumból immunhisztokémiai és molekuláris vizsgálatok is elvégezhetők, akár archivált, több éves vagy évtizedes mintákból is. Mindazonáltal a májbiopszia vitatottságát az adja, hogy magas költségű beavatkozás és invazív eljárás révén, ha ritkán is, de számos súlyos, akár életveszélyes szövődménnyel is járhat. Az esetek mintegy 0,3-5%-ában fordul elő komplikáció, ami az egészen enyhe fájdalomtól a súlyos vérzésig változhat. A mortalitás 0,009-0,12% közötti (Afdhal 2004, Baranova és mtsai. 2011).

1.3.1.1. Digitális patológia - morphometriai analysis

A metszetek digitalizálása több évtizedes múltra tekint vissza. A metszet scannerek alkalmazásával lehetővé vált, hogy számítógépes monitoron át vizsgáljuk a mintákat. A digitális mikroszkópia kiküszöböli a mikroszkópos szöveti/sejtminták elemzésének eddig feloldhatatlan hátrányát, miszerint annak csupán ezredrésnyi töredékéről kaphatunk információt. Eddig a metszet különböző - négyzetmikrométer nagyságrendű, reprezentatívnak minősített - területeiről készített digitális fénykép feldolgozására volt csak lehetőség. A digitális metszetek a teljes szövettani vizsgálati anyag fénymikroszkóppal értékelhető információtartalmát, nagy szériaszámban, időbeli sorrendiségben, a kórfolyamat progressziójának, illetve a terápia okozta regresszió vertikumában képesek megjeleníteni. A digitális metszetanalysis által megteremtett

lehetőségek módot kínálnak arra, hogy objektív értékelést nyújtsanak a vizsgáló számára, illetve számszerű adatokkal támasszák alá - akár megindokolják - a diagnózist. A módszer ilyen módon új típusú segítséget nyújt a kórfolyamat természetes lefolyásának, az aktuális stádiumnak, a progresszióknak és a kezelés hatékonyságának pontosabb megítéléséhez. A hagyományos módon leletezett májbiopsziás anyagok retrospektív vizsgálata is lehetővé válik, valamint ilyen formában történő archiválásuk és kiértékelésük is (Gombas 2000, Gombas és mtsai. 2004).

A májfibrosis mértékének megítélése különböző számítógépes szoftverek segítségével történik, a portális terek nagyságának, kerületének, területének meghatározásával és az így nyert adatokból számszerűen (az ép területhez viszonyítva, százalékban kifejezve) meghatározható a fibrosis mértéke (Hall és mtsai. 2013, Huang és mtsai. 2014). Mivel a digitális metszet lehetővé teszi a minta diagnosztikai szintű véleményezését, a szoftver-paraméterek további pontosításán múlik a módszer szenzitivitásának/specifititásának emelése. A felmerülő kérdések függvényében, az addigi tapasztalatok alapján, a szoftver továbbfejlesztése tervezhető.

1.3.2. Szérum markerek

A vérből kimutatható markereket 3 csoportba soroljuk, lehetnek direktek, indirektek és kombináltak (**1. táblázat**). Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül, a legismertebb és leggyakrabban használt markereket soroljuk fel.

1.3.2.1. A Direkt markerek

A direkt markerek olyan enzimek, citokinek és egyéb proteinek, melyek az ECM turnoverében vesznek részt

Procollagen I carboxy terminal peptid (PICP), Procollagen III amino-terminal peptid (PIIINP) és a IV típusú kollagen

PICP A cirrhosis jó indikátorának tartják, bár inkább utal az alkoholos etiológiára, mint a májbetegség súlyosságára (Ahmad és mtsai. 2011).

PIIINP A III típusú kollagén perkurzora, az extracellularis térben procollagen peptidáz hatására hasad és az N terminalis propeptid jut a véráramba, mely a III típusú kollagén szintézisére utal. Bizonyos tanulmányok szerint inkább a gyulladás indikátoraként használható marker. Nem májspecifikus, egyéb betegségekben is nőhet a szérum szintje (pl. acromegalia, reumás betegségek, chronicus hasnyálmirigy gyulladás) (Baranova és mtsai. 2011).

IV típusú kollagen A matrix degradáció mértékét tükrözi, chronicus májbetegségekben értéke nő (Ahmad és mtsai. 2011).

Mátrix metalloproteináz (MMP's) és szöveti inhibitor metalloproteináz (TIMPs)

Az MMP közé számos szerkezetileg rokon proteolitikus enzim tartozik. A humán MMP enzimek közül a MMP-2-t, MMP-3-at és az MMP-9-et tanulmányozták legtöbbet. Az MMP-2 és proenzimjei szintjét a fibrogenesis során emelkedettnek találták, de az adatok ellentmondásosak. A MMP-9 szintjeit HCV-s beteganyagon vizsgálva negatív korrelációt találtak a betegség súlyosbodásával, továbbá a HCC diagnózisában is jól alkalmazhatónak bizonyult (Baranova és mtsai. 2011).

A TIMP molekulák az MMP aktivitását és funkcióját modulálják. A legtöbb MMP a TIMP-1 szabályozása alatt áll. A TIMP-2 a MMP-2 specifikus gátlójaként működik. Egy HCV-s betegcsoporton készült vizsgálat azt találta, hogy a TIMP-1 és TIMP-2 szintje is a fibrosis progresszió függvényében emelkedett. Más vizsgálatban összefüggést találtak a serum MMP-9 és a TIMP-1 szintje között. Chronicus májbetegségeknél a szérum MMP-9 szintje alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest és csökkent a fibrosis progresszióval, míg a TIMP-1 szintje nőtt. A szerzők véleménye szerint a TIMP-1 jó non-invazív fibrosis marker lehet (Badra és mtsai. 2010, Ahmad és mtsai. 2011).

Cytokinek

TGF- β egy pleiotróp citokin, mely részt vesz a szövetek növekedésében, differenciálódásában, az ECM képzésében és az immunválaszban is. Három izotípusa ismert ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), de ezek közül csak a $\beta 1$ forma kapcsolódik a máj fibrogenesiséhez.

A TGF- β 1 és a fibrosis progresszió közötti szoros kapcsolat széles körben elfogadott (Baranova és mtsai. 2011).

Hyaluronsav (HA)

Glükózaminoglikán molekula, az ECM alkotó eleme, melyet a csillagsejtek szintetizálnak. Súlyos fokú fibrosis és cirrhosis kimutatására használható marker. Néhány tanulmányban különösen jó fibrosis markernek találták (Halfon és mtsai. 2005, Suzuki és mtsai. 2005, Ahmad és mtsai. 2011).

YKL-40 (Chondrex)

Az ECM lebomlási terméke. Szérum szintje jól korrelál a fibrosis szövettani stádiumaival (Tran és mtsai. 2000, Baranova és mtsai. 2011).

Laminin

A csillagsejtek által szintetizált glikoprotein molekula. A máj bazális membránjának fő alkotó eleme. A fibrogenesis során a laminin felhalmozódik a perisinusoidális térben az erek körül és a portális terek körül. A laminin és pepszin rezisztens laminin szint emelkedése jól korrelál a perisinusoidális fibrosis mértékével (Korner és mtsai. 1996).

1.3.2.2. A fibrosis indirekt markerek

ALT A májsejtkárosodás egyik legérzékenyebb markerének tartják, főként vírus és toxikus ártalmak esetén. Ugyanakkor számos tanulmányban leírják, hogy emelkedésének mértéke gyakran nem arányos a gyulladásos aktivitással (magasabb enzim érték nem feltétlenül jelent mindig magasabb HAI-t), és nem mindig tükrözi a májkárosodás mértékét, vagy a betegség progresszióját (McCormick és mtsai. 1996, Shiffman és mtsai. 2006). Chronicus HBV és HCV hepatitisben igazolták, hogy a normális, pontosabban a laboratóriumi referencia tartományon belüli, ALT érték nem zárja ki chronicus – akár jelentős aktivitást mutató – hepatitis fennállását (Osztrogonacz és mtsai. 2004, Hunyady 2007).

AST- a gyulladásos aktivitás fontos markere, jobbnak tartják, mint az *ALT*-t (Zechini és mtsai. 2004), ugyanakkor a korlátai hasonlóak.

AFP- cirrhotikus betegeken, májtumorokban értéke nő. Emelkedik a szintje akut és chronicus HCV infectioban, toxicus ártalmakkor is (Cedrone és mtsai. 2000).

Thrombocyta szám- a májsejtek csökkent thrombopoetin termelése csökkenti a vérlemezkék számát. Fibrosis progresszió során, számuk csökken. Májcirrrosisban a hypersplenía a thrombocytopenia egyik fő oka. Cirrhosis és kevésbé előrehaladott fibrosis stádiumok differenciálására alkalmazható, de a fibrosis stádiumokat (F1-F3) nem különíti el (Lackner és mtsai. 2005).

PT- thromboplastin idő- a máj szintetizáló képességét tükrözi. A PT normál értéke: 12-15 sec. A PT idő megnyúlása a cirrhosis és a nyelőcső vénatágulat korai mutatója (Pilette és mtsai. 1999).

AAR (AST/ALT) számos vizsgálat készült az elmúlt években pro és kontra eredményekkel ezen marker diagnosztikus pontosságáról különböző etiológiák esetén, de fibrosisban nem találták egyéb markerekkel összehasonlítva jobbnak (Giannini és mtsai. 2003).

APRI – AST-to-Platelet Ratio Index

$$APRI = \frac{AST (IU / l) / ULN (IU / l)}{Thrombocyta szám (10^9 / l)} \times 100, \text{ ahol ULN az AST-szint normális értékének}$$

felső határa, általában 40 IU/l. (Wai és mtsai. 2003). Több szerző tartja jó diagnosztikus markernek fibrosis és cirrhosis elkülönítésére, de a fibrosis stádiumok közti pontos differenciálásra nem alkalmas.

PGA és PGAA- a PGA a γ -glutamil-transzferáz, az apolioprotein A1 és a prothrombin értékből képzett index, a PGAA ennek módosított formája az α -2-macroglobulin hozzáadásával. Kapcsolatba hozható a gyulladással és a fibrosissal is. Fibrosisban a diagnosztikus pontossága relatív alacsony (Baranova és mtsai. 2011).

Fibroindex AST, thrombocytá szám, serum IgG szintből képzett index. HCV-s betegeken használják, magas prediktív értékű szignifikáns fibrosisban (Koda és mtsai. 2007).

Fibrotest öt marker kombinációja: α -2-macrogloblin, haptoglobin, apolipoprotein A1, γ -glutamil transferase, összbilirubin. 85%-os specificitású és 75%-os szenzitivitású módszer (Baranova és mtsai. 2011).

Acti-test módosított Fibrotest, az ALT értékkel egészítik ki. Tükrözi a necroinflammációt és a cirrhosist. HCV-s gyermekeknél is alkalmazzák a biopsia helyett (Poynard és mtsai. 2003).

Forns index- γ -glutamil transferase, thrombocytá szám, kor, koleszterin szint kombinációja. Segítségével az enyhe fibrosist (F0-F1) lehet elkülöníteni a szignifikánstól (F2-F4) (Rossi és mtsai. 2007).

Model 3 Az AST-t, a PT-t, és a thrombocytá számot tartalmazza, cirrhosis igazolására használható (Lok és mtsai. 2005).

Goteborg University Cirrhosis index (GUCI) Képzéséhez az AST, a prothrombin-INR, és a thrombocytá szám ismerete szükséges. Cirrhosis diagnosztizálására alkalmas (Islam és mtsai. 2005).

Fibrosis index Thrombocytá szám, albumin szint. Az enyhe és a súlyos fokú fibrosis, valamint a cirrhosis elkülönítésére alkalmas (Ohta és mtsai. 2006).

Phol score Az AST, az ALT és a thrombocytá számból számolják. A jelentős fokú fibrosis és a cirrhosis kimutatására alkalmazható, e tekintetben magas a negatív prediktív és pozitív prediktív értéke is (Pohl és mtsai. 2001).

Bonacini index Az ALT/AST arányból, az INR értékből és a thrombocytá számból képezik. Szignifikáns fibrosis igazolására alkalmas (Bonacini és mtsai. 1997, Ahmad és mtsai. 2011).

1.3.2.3. *Kombinált markerek*

A kombinált markerek a direkt és indirekt markerek kombinációból létrehozott képletek, indexek.

ELF- European Liver Fibrosis Group által kifejlesztett algoritmus a fibrosis értékelésére. Az ECM-ban zajló fibrogenetikus-fibrolytikus folyamatokat írja le a hyaluronsav, a PIIINP és a TIMP-1 és az életkor felhasználásával (Ahmad és mtsai. 2011).

FibroSpect- szintén 3 paraméter kombinációja: HA, TIMP-1, α -2-macroglobulin. Képes elkülöníteni az enyhe és súlyos fibrosist (Patel és mtsai. 2004, Zaman és mtsai. 2007).

FibroMeter - HA, AST, thrombocytá szám, prothrombin, α -2-macroglobulin, urea, és az életkor alapján meghatározott index. Nem csak vírus etiológia esetén alkalmazzák, vizsgálták ALD, NAFLD esetén is. Magas diagnosztikus pontosságú, fibrosis progresszió követésére is alkalmas (Cales és mtsai. 2009).

Hepascore bilirubin, γ -glutamil transferase, HA, α -2-macroglobulin, nem, életkor alapján meghatározott index. Előrehaladott fibrosis kimutatására alkalmazható (Guechot és mtsai. 2010).

Shasta index HA, AST, albumin alapján meghatározott index. A Fibroteszthez hasonló megbízhatóságú, HCV/HIV co-infectioban vizsgálták (Baranova és mtsai. 2011).

Apricot (Fib-4) AST, ALT, thrombocytá szám, életkor alapján meghatározott index. Vírus hepatitiszknél alkalmazzák (Vallet-Pichard és mtsai. 2007).

Sud index a beteg életkora, AST, koleszterin, insulinesistencia, alkohol fogyasztás alapján számított index. Súlyos fokú fibrosis kimutatására alkalmas, magas PPV értékkel (Sud és mtsai. 2004).

Testa index thrombocytá szám, lép átmérő alapján meghatározott index. A szövettani fibrosis stádiummal 78%-os egyezést találtak (Testa és mtsai. 2006).

1.táblázat: A serum fibrosis markerek összefoglalása

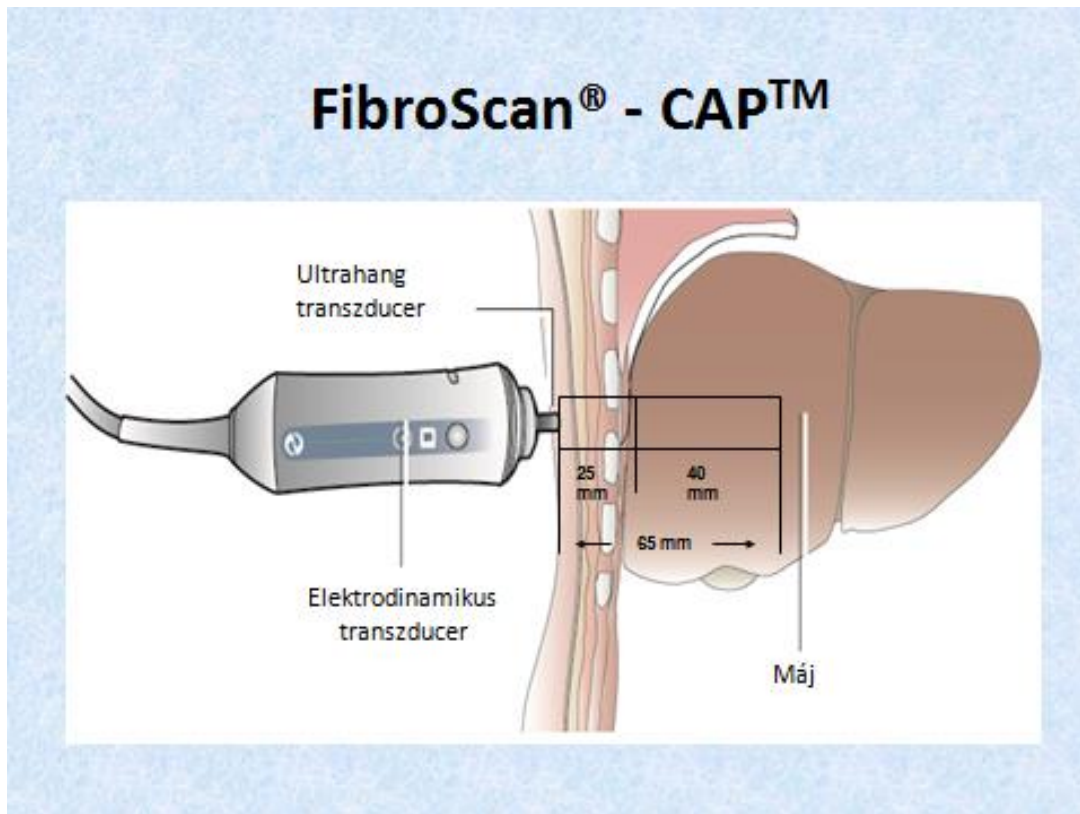
<i>Direkt markerek</i>	<i>Indirekt markerek</i>	<i>Kombinált markerek</i>
PICP PIIINP IV. típusú collagen MMP'S TIMP's TGFβ Hyaluronsav YKL-40 Laminin	ALT AST AFP AAR (<i>AST/ALT</i>) Thrombocytaszám tromboplasztin idő APRI- (<i>AST-to-Platelet Ratio Index</i>) PGA PGAA Fibroindex Acti-test Forn index Model3 Fibrosis index Goteborg University Cirrhosis index (<i>GUCI</i>) Phol-score Bonacini index	ELF-test FibroSpect FibroMeter Hepascore Shasta index Apricot (Fib-4) Sud index Testa index

1.3.3. Képkalkotó/scanning technikák

ARFI: Acoustic radiation force impulse A konvencionális ultrahang vizsgálatot kombinálja elasztográfiával, így az UH-gal meghatározott helyen tudja mérni a LS-t.

MRI Mágneses rezonancia a májfibrosis mérésére egy módosított eszközt használnak az ún *mágneses rezonancia elasztográfot (MRE)* mellyel a LS jó hatásfokkal magas, szenzitivitással és specificitással mérhető. Hátránya a magas költsége, és hogy általában nehezen elérhető, továbbá, hogy klausztrofóbiásoknál és súlyos haemochromatosisban nem végezhető (Baranova és mtsai. 2011).

Tranziens elasztográfia (TE): A TE során a készülék egy kis amplitúdójú, alacsony frekvenciájú (50 Hz) vibrációval keltett „lökéshullám” terjedési sebességét méri a májszövetben (ultrahang segítségével), mely egyenesen arányos a szövet rigiditásával. A TE során egy kb. 1 cm átmérőjű, 4 cm hosszú virtuális szövethengert mérünk, a bőrfelszíntől mért 25 és 65 mm távolság között. Ez legalább százszorosa egy májbiopsia során nyert szövethenger térfogatának. A vizsgálat járóbetegként végezhető, fájdalomtalan, előkészítést nem igényel, csupán néhány percig tart. **(3. ábra)**



3.ábra. A Fibroscan—CAP mérésének sematikus ábrája. *TE során egy kb. 1 cm átmérőjű, 4 cm hosszú virtuális szövehengert mérünk, a bőrfelszíntől mért 25 és 65 mm távolság között.* <http://www.fibroscan.com/fr/>

A gyártó ajánlásának megfelelően legalább 10 valid mérésre van szükség, a szoftver automatikusan – a vizsgálonak nincs lehetősége beavatkozásra – azonnal kiszámolja a kiloPascalban (kPa) kifejezett eredményt (LS), mely a mért értékek mediánja. A vizsgálat - technikai értelemben vett – minőségét, és így értelemszerűen az eredmény értékét, megbízhatóságát két további – a szoftver által kijelzett, és a leleten kötelezően feltüntetendő – érték mutatja: az interkvartilis arány (IQR), mely a valid mérések „szórásának” jelzője, és nem lehet nagyobb, mint a LS 30%-a; illetve a sikeres és az összes mérési kísérletek arányát (success rate – SR), mely optimális esetben legalább 60%.

A vizsgálat elvégzését technikailag nehezíti az elhízás (elsősorban a mellkasfal vastagsága a lényeges), a szűk bordaköz, a mellkas deformitás, a nagyfokú emphysema, a nagyobb mennyiségű ascites (ha a mellkasfal és a máj között folyadék van, a TE elvégzése nem lehetséges). Irodalmi adatok szerint a sikertelen vizsgálatok aránya 2,4-9,4%, melynek két leggyakoribb oka a magas BMI (>28) és a vizsgálatot végző gyakorlatlansága (<500 sikeres vizsgálat) (Konate és mtsai. 2006, Fraquelli és mtsai. 2007, Horváth 2008).

A teljesség kedvéért megemlíjtük egy új technika alkalmazását, mely a máj zsírtartalmának mennyiségi meghatározására szolgál, bár munkánkban ezt az eljárást nem alkalmaztuk.

Ezt az új fizikai változót Controlled Attenuation Parameter-nek (CAP) nevezik, meghatározását kifejezetten a májra, mint célszervre dolgozták ki. A FibroScan[®]-t továbbfejlesztve, lényegében egy szoftverbővítéssel, tették alkalmassá a TE során a lökéshullám terjedési sebességének meghatározásához használt UH hullámok elnyelődésének mérésére. Az UH hullámok attenuációja annál kifejezettebb, minél magasabb a májszövet zsírtartalma. A CAP mérése automatikusan (a szoftver vezérlésével) történik, így elvégzéséhez nem szükséges az UH vizsgálatban szerzett jártasság (Sasso és mtsai. 2010, de Ledinghen és mtsai. 2012).

1.4. A microRNS molekulacsalád

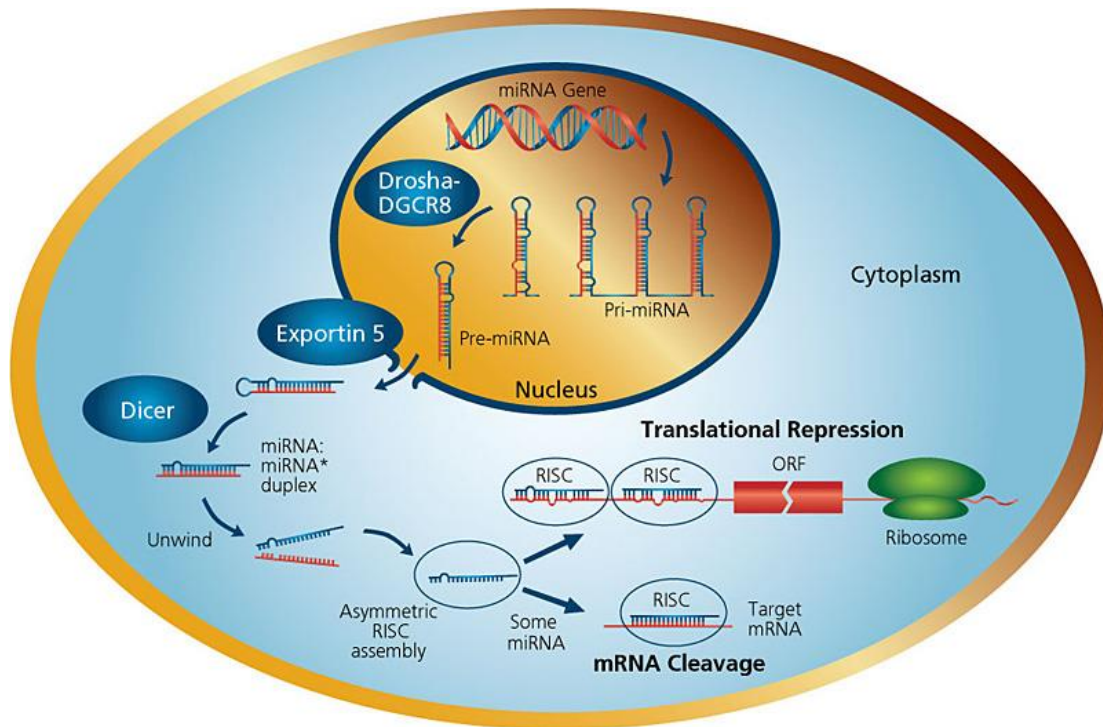
A növény- és állatvilágban több mint 20 éve ismertek a microRNS-ek (miR) melyek a génexpressziót általában negatívan szabályozó rövid RNS molekulák. Számuk az intenzív kutatásoknak köszönhetően folyamatosan emelkedik, mára már több mint 2588 érett és 1881 prekursor humán miR-t tartunk nyilván, melyek egy internetes adatbázison elérhetőek (<http://www.mirbase.org>) (Griffiths-Jones és mtsai. 2006).

E molekulák expressziójának mértéke kóros állapotokban megváltozhat a normálishoz képest, és így fontos diagnosztikus és terápiás célpontok lehetnek,

különösen, mivel a plazmából is kimutathatóak (Cho 2010, Mizuguchi és mtsai. 2016). Expressziós változásait számos daganatos és gyulladásos megbetegedésben vizsgálták (Lackner és mtsai. 2005, Shenouda és Alahari 2009).

A miR-ek biogenesise több lépcsős folyamat. Az érett miR molekulákra jellemző, hogy fehérjét nem kódolnak és megközelítőleg 22 nukleotid hosszúságúak. A miR-t kódoló régiók a DNS-en mintegy 50%-ban az intronokban helyezkednek el (ún. mirtron), másrésztük önálló transzkripció egységeiben vagy szekvenciálisan, ún. miR clusterekben (3-6 miR szekvencia 1-5 kb távolságon belül) helyezkedik el (Li és mtsai. 2009).

A miR-k a transzkripciójukat követően érési folyamaton mennek keresztül. Az elsődleges pri-miRNS a Drosha endonukleáz hatására 60-70 bp hosszú pre miRNS-re bomlik, mely Exportin 5 hatására a citoplasmába kerül, és itt a Dicer endonukleáz közreműködésével válik érett miR-é. Ez az érett forma 19-22 nukleotid hosszúságú, kettős láncú RNS, mely helikáz aktivitásra válik egyláncúvá. Ezt követően a RISC-Ago2 komplex részeként kötődik a cél mRNS 3' nem transzlálódó részéhez, és ez a célgén poszttranszkripcionális gátlását eredményezi. **(4. ábra)** (Bartel 2004, Kim 2005, Carthew és Sontheimer 2009). Mivel e hatás kifejtéséhez nem szükséges a teljes komplementaritás, egy miR akár több száz mRNS-t is gátolhat, és megfordítva egy mRNS-hez többféle miR is kötődhet, néhány miR akár több (2-3) kötőhellyel is rendelkezhet ugyanazon az mRNS-en (Kim 2005).



4. ábra. A microRNS biogenesis

Az elsődleges pri-miRNS a Drosha endonukleáz hatására pre miRNS-e bomlik, mely a citoplasmába kerül Exportin 5 hatására és itt válik érett miRNS-é a Dicer endonukleáz közreműködésével. Ez a forma kettős láncú RNS, mely helikáz aktivitásra válik egyláncúvá. A RISC-Ago2 komplexben a cél mRNS-hez kötődve kifejti a poszttranszkripcionális gátlást (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/mirna/learning-center/mirna-introduction.html>).

A miR-ek az epigenetikai szabályozás résztvevőiként számos sejtfunkció irányításában vesznek részt. Szabályozzák az egyedfejlődés időbeli lefolyását, a sejt differenciációt a szervek kialakulását, az őssejtek osztódását. Az intermediér anyagcserében és a homeosztázis fenntartásában is részt vesznek, szerepük van a jelátviteli utak enzimeinek szabályozásában, az apoptózisban, a haemopoetikus vonal differenciálódásában, a vírus és a gazdaszervezet interakciójában valamint a tumorok kialakulásában (Bala és mtsai. 2009, Fukumoto és mtsai. 2016).

A májban számos sejtípus van (hepatocyták, csillag sejtek, biliaris sejtek, Kupffer sejtek stb), melyek miR mintázata még nem teljesen ismert. Tudjuk, hogy a hepatocytákban van néhány karakterisztikus megjelenésű miR. Ezek közül kiemelkedő

a miR-122, mely a máj összes miR tartalmának mintegy 70%-át adja (Lagos-Quintana és mtsai. 2002). Ez a miR érdekes módon pozitív szabályozója (valószínűleg indirekt módon) a koleszterin és triglicerid akkumulációjának és a zsírsav metabolizmusnak a májban (Hu és mtsai. 2012). Megfigyelték, hogy a HCV replikációját és transzlációját is stimulálja *in vitro* (Jopling és mtsai. 2005), azonban *in vivo* nem találtak korrelációt a miR-122 expresszió és az intrahepatikus vagy serum HCV szintek között, így valószínűsíthető, hogy a miR-122 szerepe a HCV RNS-ének védelme az exonukleáz hasítástól (Sarasin-Filipowicz 2010). Adatok vannak arra vonatkozólag is, hogy a miR - 122 szintje csökken a májszövetben HCV indukált fibrosisban míg a plazmában a fibrogenesisnek megfelelően emelkedik. Korrelációt találtak HCV-s betegek keringő miR-122 szintje, a szérum ALT érték, és a biopsiában mért HAI érték között, ugyanakkor a serum miR-122 szint és a májfibrosis között nem találtak kapcsolatot (Bihrer és mtsai. 2011). Egy másik tanulmány fordított korrelációt talált a májban mért miR-122 expresszió és a funkcionális valamint a histopathologiai májkárosodás között (Morita és mtsai. 2011). Májszövetben vizsgált további miR-eket is kapcsolatba hoztak fibrosissal, például a mir-150 és 194 alulszabályozottságát észlelték (Venugopal és mtsai. 2010). A miR -195 – ciklin E1 deregulációja és p21 expresszió fokozása révén – béta –interferon vezérelt HSC aktivációt és fibrogenesist indukált (Haybaeck és mtsai. 2011). Továbbá miR-27a és -27b alulszabályozottsága a csillagsejtek nyugalmi állapotát és a lipidcseppek újrachalmazódását idézte elő, így ezek a fibrogenesis ellen hatnak (Ji és mtsai. 2009).

A miR-29- család tagjairól fibrosissal kapcsolatban azt mutatták ki, hogy csökkent expressziójuk fokozza a különböző ECM komponensek expresszióját és ez a fibrosis szabályozásában tapasztalt szerepe TGF- β 1 és NF- κ B függő (Haybaeck és mtsai. 2011, Kwiecinski és mtsai. 2011).

A miR-21 fibrosisban betöltött szerepe kevésbé ismert; irodalmi adatok szerint chronicus HCV fertőzésben korrelációt észleltek a vírus replikáció és a miR-21 expresszió között, valamint a miR-21 felül szabályozott állapotát írták le HCV-asszociált-, illetve CCL4-mediált fibrosisban (Selaru és mtsai. 2009). De szintén magas miR-21-szintet detektáltak regenerálódó májban, ahol feltehetően a proliferációhoz

szükséges a PI3K/AKT/mTOR útvonalat gátló PTEN gátlásában játszik szerepet a miR-21 (Yan-nan és mtsai. 2014).

A **miR-214-et** az irodalomban leginkább a HCC-val kapcsolatban említik, melyben alulszabályozott, és jó marker lehet a benignus és malignus elváltozások elkülönítésében (Wang és mtsai. 2012).

A **miR-221/222-t** is főként HCC viszonylatában vizsgálták, de egér sejt kultúrákon és human mintákon végzett vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy szerepük van a csillagsejtek aktiválásában és a fibrosis progressziójában is (Ogawa és mtsai. 2012).

A **miR 224** szerepét sejtproliferációval, migrációval és invázióval, valamint apoptosissal kapcsolatban vizsgálták széleskörűen HCC-s betegeken (Zhang és mtsai. 2013). De megfigyeltek pozitív korrelációt a fibrosis score és a miR 224 expresszió között chronicus C hepatitiszes esetekben (Estebaud és mtsai. 2011).

2. Célkitűzések

A fentiek alapján célunk volt, a ”hagyományos” invazív és non-invazív módszerek, valamint újabb vizsgálati lehetőségek értékének megállapítása, egymással való összehasonlítása különböző etiológiájú májfibrosis során. Ezen célkitűzés megválaszolására a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen korreláció figyelhető meg a hagyományos szemi-quantitatív fibrosis meghatározási módszer (Metavir) és a digitális morphometriai analysis (DMA) során nyert adatok között a máj tűbiopszáz anyag elemzése során?
2. Segítheti-e a fibrosis stádium pontosabb megítélését a digitális morphometriai analysis alkalmazása?
3. Milyen mértékben korrelálnak a histológiai vizsgálatok alapján megállapított és a non-invazív módszerekkel (Transiens elastographia (TE) során mért Liver stiffness (LS) valamint APRI) meghatározott fibrosis stádiumok?
4. Befolyásolja-e a steatosis mértéke, a minta nagysága (a portális mezők száma), az egyidejű gyulladásos aktivitás mértéke, illetve a nem, a különböző módszerekkel végzett fibrosis meghatározások pontosságát?
5. Korrelál-e a HCC-ban eltérést mutató miR-ek (miR-21, miR-122, miR-214, miR221/-222, miR-224) intrahepaticus expressziója a fibrosis súlyosságával és a májbetegség biokémiai aktivitását jelző ALT értékkel?
6. Befolyásolja-e az idült, diffúz májbetegség etiológiája a hagyományos szemi-quantitatív módszerrel megállapított fibrosis stádium (Metavir), az LS érték és a különböző miR-ek expressziója közötti kapcsolatot?

3. Módszerek

3.1 Betegek

A retrospektív vizsgálathoz olyan betegek májbiopsziás mintáit használtuk fel, akiknél Transiens elasztográfia (TE) is történt. Magyarország hepatológiai centrumaiból származó, mintegy 200 mintából azokat az eseteket dolgoztuk fel, melyekben a májbiopszia és a TE időpontja között eltelt idő nem haladta meg a 90 napot, valamint, a biopszia időpontjában (± 1 nap) ALT, AST és thrombocytaszám meghatározás is történt. E kritériumoknak 96 minta felelt meg (53 nő, 43 férfi, életkoruk:15-67 átlag:40,05 év). A betegek klinikopathológiai adatait az **2. táblázatban** tüntettük fel.

2. Táblázat Klinikopatológiai adatok a digitális morphometriai analysisben

Etiológiai csoport	eset-szám	Etiológiai alcsoport	Fibrosis stage (METAVIR)	DMA %	LS (KPa)	APRI	ALT level (U/L)
Chroni- cus vírus	56	HCV (53) HBV (3)	F0 (4)	0.2-4.4	3.2-5.3	0.1-1.4	14-125
			F1 (17)	0.6-10.7	3.8-11.9	0.1-2	10-152
			F2 (15)	2.3-10.6	4.2-20.4	0.1-13.2	12-376
			F3 (18)	0.8-25.9	5.6-23.9	0.1-22.6	12-319
			F4 (2)	18-25.1	20-24.3	1-3	27-62
Auto- immun	22	AIH (9) PBC (6) PSC (4) overlap (3)	F0 (4)	1.1-3.7	6.1-6.9	0.4-1.3	20-452
			F1 (3)	0.8-5.6	5.3-7.6	0.1-0.1	10-20
			F2 (5)	2.8-8.9	4.6-14.3	0.2-1.4	16-275
			F3 (8)	5.1-37.3	6.1-18	0.1-1.8	17-196
			F4 (2)	12.6-33.4	20.6-45.7	0.2-1.9	226-83
vegyes etilógia	18	NAFLD (2) ALD (5) Crypt.(7) Toxic (3) Wilson(1)	F0 (4)	0.3-3.9	4.8-11.8	0.04-0.3	12-82
			F1 (6)	1.5-9.2	3.7-37.4	0.25-1	18-271
			F2 (3)	7.9-20	11.9-45	0.3-1.4	12-84
			F3 (3)	11-11.5	7.3-20.2	0.4-0.5	37-65
			F4 (2)	27.1-31	75	1-1.6	23-32
Összes	96	–	F0 (12)	0.2-4.4	3.2-11.8	0.04-1.4	12-452
			F1 (26)	0.6-10.4	3.7-37.4	0.1-1	10-271
			F2 (23)	2.3-20	4.2-45	0.1-13.2	12-376
			F3 (29)	08-37.4	5.6-23.9	0.1-22.6	12-319
			F4 (6)	12.6-33.4	20-75	0,2-3	23-83

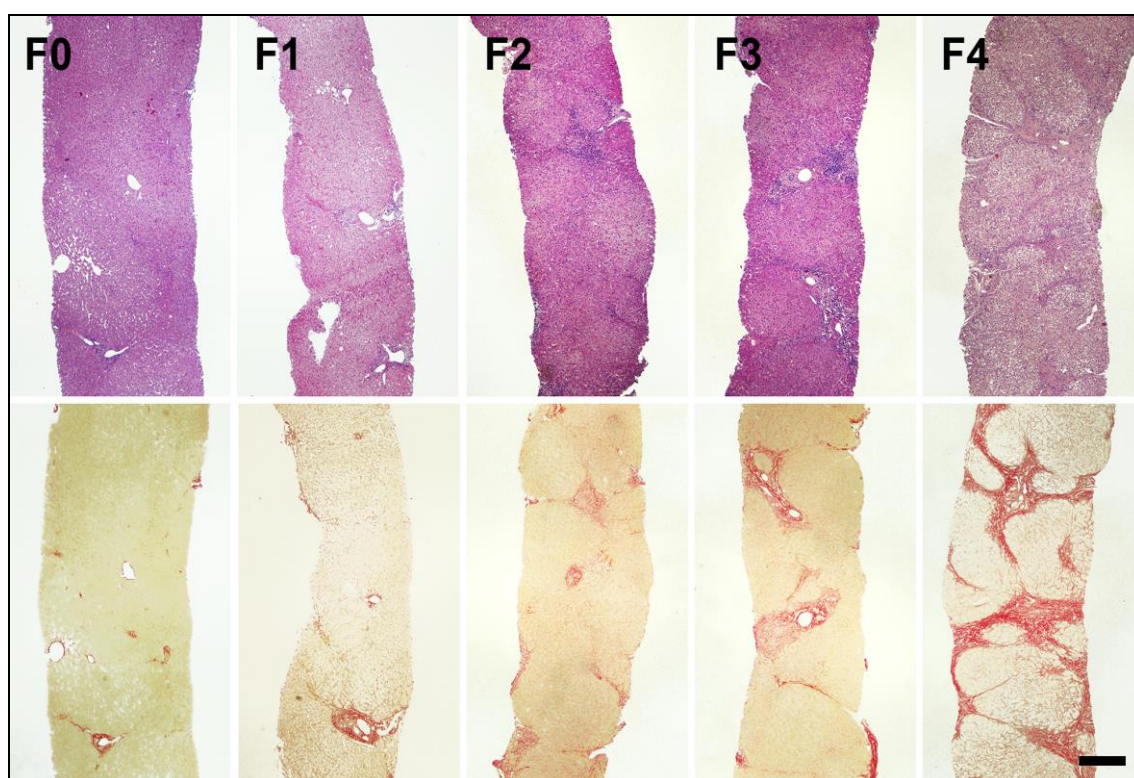
DMA: digitális morphometriai analysis LS: liver stiffness, APRI: aminotranszferáz vérlémezke hányados index ALT: alanin aminotranszferáz, AIH: autoimmun hepatitis, PBC: primer biliaris cirrhosis, PSC: primer sclerotisalo cholangitis, HCV: hepatitis C vírus, HBV: hepatitis B vírus, ALD: alkoholos májbetegség, NAFLD: nem alkoholos eredetű steatosis Crypt.: cryptogén (ismeretlen etiológia)

A mintákból a májfibrosis mértékének meghatározása szemi-quantitaív módszerrel – a Metavir score szerint – történt, valamint a metszetek digitalizálása után a fibrosis mértékét digitális morphometriai analysis során százalékosan is meghatároztuk.

Részben pénzügyi illetve technikai okok miatt nem tudtuk az összes mintából elvégezni a molekuláris vizsgálatokat. A molekuláris elemzés során 52 mintát vizsgáltunk.

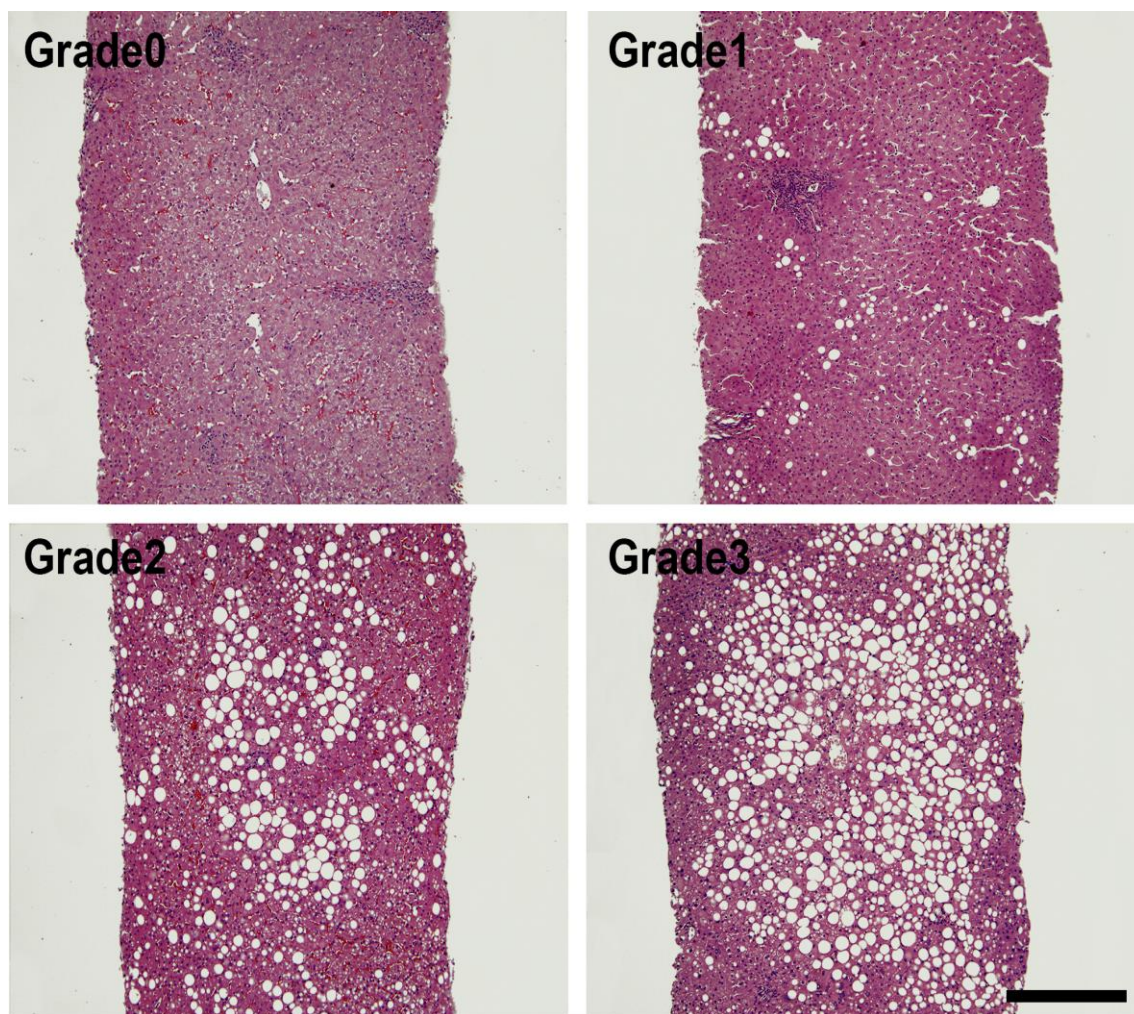
3.2 Metszetkészítés

24 órás formalin fxálást követően paraffinba ágyazott 4-5 μm vastagságú metszetekből, Haematoxillin-eosin (HE)-festést és Picrosirius kötőszöveti festést végeztünk minden mintán. A bioptátumok mérete: 1-5 cm hosszú és minimum 5 portális mezőt tartalmaztak. A fibrosis mértékét Metavir score szerint adtuk meg F0-F4-ig (F0=nincs fibrosis, F4= cirrhosis) (Poynard és mtsai. 1997, Corpechot és mtsai. 2006).



5. ábra Metavir szerinti fibrosis stádiumok. *A felső sorban Haematoxillin-eosin festéssel F0-F4-ig láthatók májbiosziás minták, az alsó sor ugyanezen minták Picrosirius festéssel (méretarány 50 μm)*

A fibrosis mellett a mintákban meghatároztuk az értékelhető portális terek számát, valamint Brunt szerint a zsír mennyiségét (Grade1 <33%, Grade2 34-66%, Grade 3 >66%) (Brunt és mtsai. 1999).**(6. ábra)**



6. ábra A zsír mennyiségi vizsgálata májbiopsziás mintákban *Grade 0: nincs jelen zsír, Grade 1:<33% a zsír mennyisége. Grade 2:34-66% a zsír mennyisége, Grade 3:>66% a zsír mennyisége.(méretarány.100μm)*

A HCV-s betegek mintáin a histológiai aktivitási indexet (HAI) is vizsgáltuk (Ishak és mtsai. 1995)

3.3. Tranziens elasztográfia (Fibroscan)

Minden beteg esetében készült tranziens elasztográfia (FibroScan 502, Echosens, Paris, France) a szövettani mintavétel időpontjához képest +/- 90 napon (átlag:18,6 nap) belül.

A vizsgálatokat két centrumban (Pécsi Tudományegyetem, I. Belklinika, dr. Pár Gabriella, illetve Budai Hepatológiai Centrum, Budapest, dr. Horváth Gábor) végezték. A méréseket hanyatt fekvő helyzetben, a máj jobb lebenye felett, a jobb alsó bordák között végezték (jellemzően ott ahol a májbiopsia is történik). Az eredményt – a gyári, illetve a hazai és a nemzetközi szakmai ajánlásoknak megfelelően – akkor tekintettük elfogadhatónak, ha legalább 10 értékelhető mérésen alapult (az LS értéke 10 mérés mediánja), és a mérések interkvartilis aránya (IQR) nem haladta meg a LS érték 30%-át. (7. ábra)

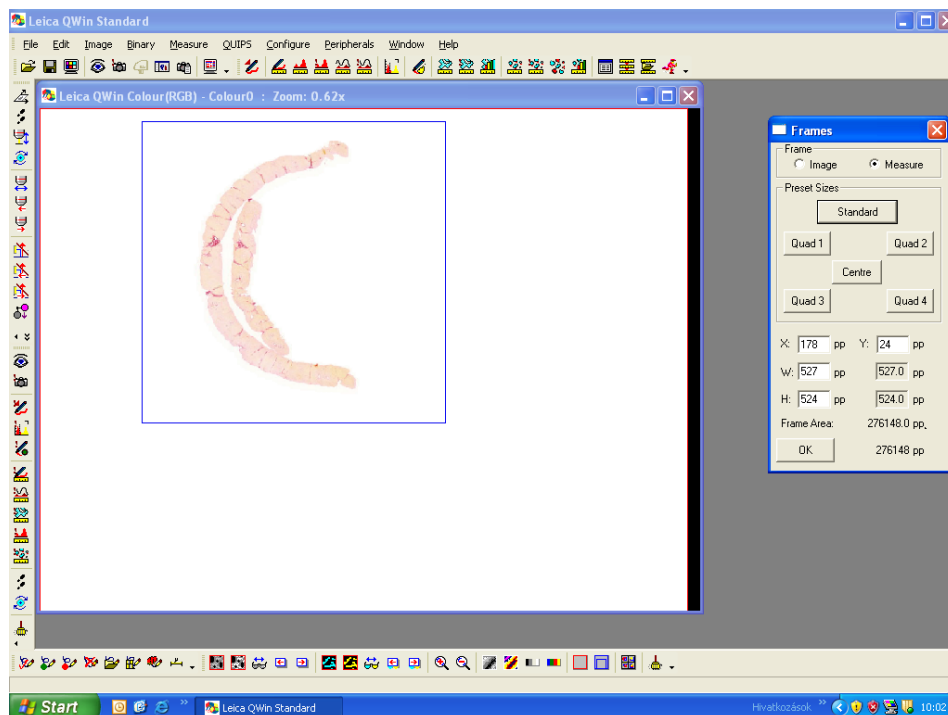


7. ábra. A Fibroscan készülék fényképe. A kijelzőn látható a Liver Stiffness értéke kilopascalban megadva. (Dr. Horváth Gábor anyagából)

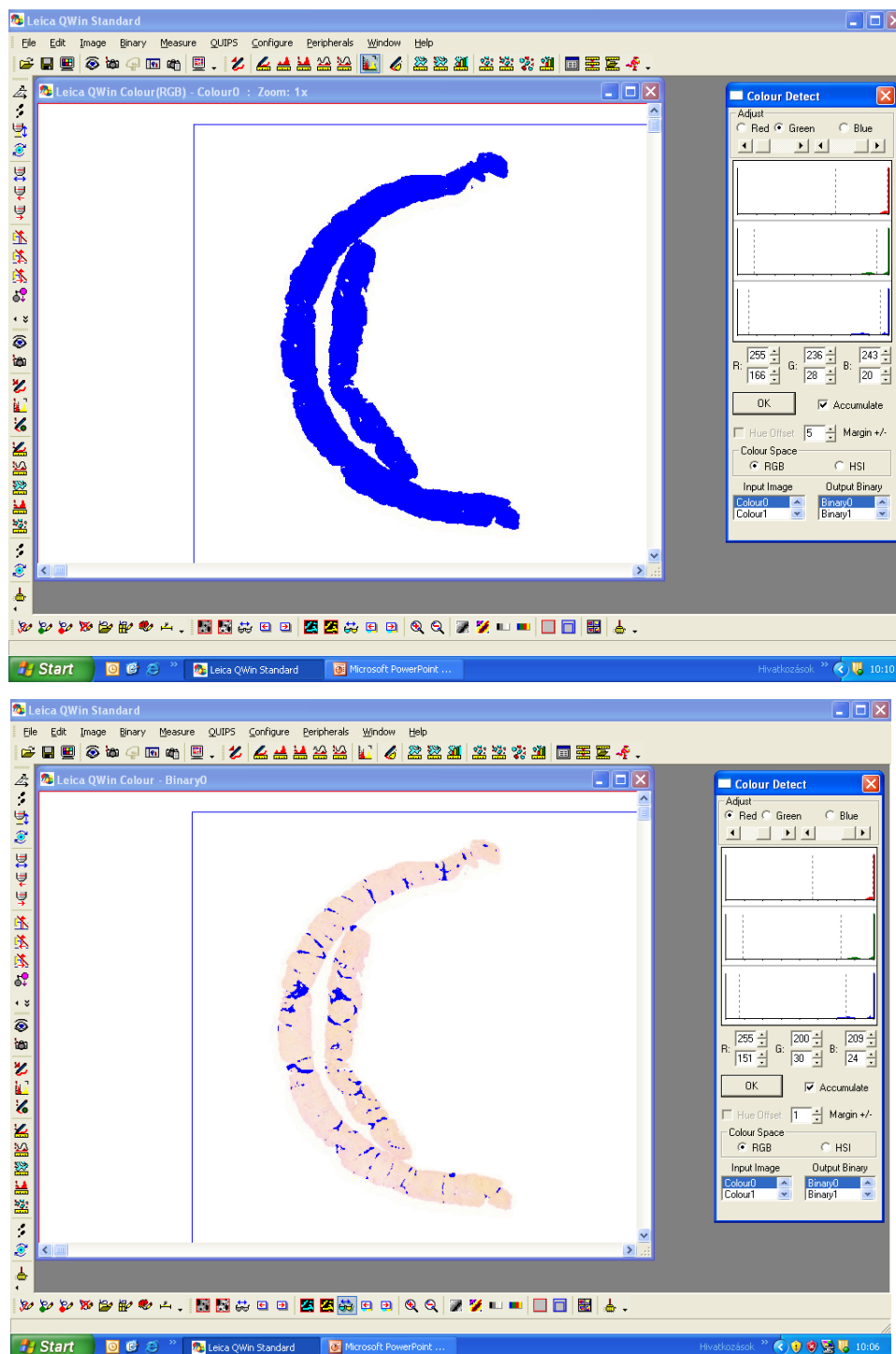
3.4. Digitális morphometriai analysis

A quantitativ analysis során Mirax Midi slide scannert használtunk a tárgylemezek digitalizálására (3D Histech, Budapest, Hungary). A kamera 20x Zeiss Plan-Apochromat objektívvel Marlin F14C volt ellátva. A fibrosis mértékének megítélése Leica QWin V3 morphometriai softver (Leica Microsystem Imaging Solution Ltd., Cambridge, UK) segítségével történt. A fibrosus területek, portális terek, szeptumok nagyságának, területének meghatározása pixelben történt. Az így nyert adatokból adódik a fibrosis mértéke, az összes terület százalékos arányban. (8/a, 8/b. ábra)

8/a ábra



8/a ábra Digitális morphometriai analysis. Minden mintát Picrosirius festéssel festettünk meg, melyben a kötőszövet piros színű. A digitalizált metszetről fénykép készült (20x)



8/b ábra. A teljes minta nagyság lemérését követően a fibrotikus terület nagyságát (pixelszámban megadva) mérjük le és százalékban kapjuk meg a fibrosis arányát a teljes minta nagysághoz képest (20x)

3.5. Biokémiai vizsgálatok

A biopszia időpontjában (+/-1 nap) minden betegtől vért vettek, az ALT (U/L), az AST (U/L) és a thrombocyta számból (G/L) meghatároztuk az APRI értékét $APRI = \frac{AST}{ULN} / \frac{thrombocyta\ szám}{10^9/l} \times 100$ (Wai és mtsai. 2003).

3.6 RNS izolálás

A minták RNS tartalmát RNeasy FFPE kit (Cat.Number:74404, QIAGEN, Hilden, Germany) segítségével vontuk ki módosítva a gyártó utasításait a rövid miR-ek kinyeréséhez (Doleshal és mtsai. 2008).

A 3-4 μm vastag paraffinos metszetek deparaffinálását követően proteináz K felhasználásával végeztük el a szövetek és a sejtek fellazítását. Majd DNS emésztést követően a membránra kötött nukleisavakat alkoholos mosást követően leoldottuk és Nanodrop ND-1000 készülékkel koncentrációt mértünk.

3.7. Reverz transzkripció (RT) és kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

Az egyes miR-ek expressziójának meghatározását TaqMan MicroRNA Assays-el végeztük (Applied Biosystems, Foster City, CA): miR-21 (ID:000397), miR-122 (ID:002245), miR-140 (ID:000462), miR-214 (ID:002306), miR-221 (ID:000524), miR-222 (ID:002276) és miR-224 (ID:002099). A kiválasztás alapjául szolgált, hogy ezek a miRNS-ek összefüggésbe hozhatóak májfibrosissal és hepatocarcinogenesisel (Marquez és mtsai. 2010, Borel és mtsai. 2012, Karakatsanis és mtsai. 2013). Mind az RT és qPCR lépést a gyártó előírásai szerint végeztük. Röviden, a RT TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) alkalmazásával történt 7,5 μL össztérfogatban, amely 10 ng teljes RNS-t tartalmazott. A qPCR-t TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) felhasználásával végeztük, 10 μL végtérfogatban, amely 0,65 μL RT terméket tartalmazott. Az amplifikációt ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) készüléken futattuk. A relative expressziót $2^{-\Delta\Delta C_q}$ képlet alapján számoltuk, amelyhez a miR-140-et használtuk, mint a legstabilabb referenciagént – NormFinder aplikációval meghatározva (Andersen és mtsai. 2004) –

és az F0 májminták ΔCq középértékéhez (medián) normalizálva. E referenciagén rendszerünkben stabilabbnak bizonyult az U6 snRNS-el szemben és alkalmazása májszövetben az irodalomban is publikált (Varnholt és mtsai. 2008).

3.9. Statisztikai analysis

Az F0-F4 fibrosis stádiumok közötti miR expressziós különbségeket non-parametrikus Kruskal-Wallis ANOVA tesztel vizsgáltuk STATISZTICA szoftver (9.1-es verzió) (StatSoft Inc., Tulsa, OK) segítségével. A micro RNS expresszió összefüggését a fibrosis stádiummal, a LS és az ALT értékekkel non-parametrikus Spearman korrelációval végeztük, GraphPad PRISM szoftver (verzió 5.01) (GraphPad Softver Inc, La Jolla, CA) alkalmazásával. A $p < 0,05$ feltétel teljesülése esetén tekintettük a különbséget statisztikailag szignifikánsnak

A digitalis morfometriai vizsgálat során nyert adatok elemzésére a Spearman korrelációt használtunk, szignifikánsnak tekintettük a p értéket 0,05 alatt. A vizsgálat során a Statistica 9.0 (StatSoft Inc. Tulsa, OK) szoftver verziót alkalmaztuk.

4. Eredmények

4.1 A Digitális Morphometriai vizsgálat eredményei

Összes mintára vonatkozó vizsgálatok

A 96 beteg adatainak értékelése során a fibrosis mértékének megítélésére használt histológiai és non-invazív módszerekkel kapott eredmények szignifikáns, pozitív korrelációt mutattak. A legerősebb korreláció a Metavir és a DMA eredmények között mutatkozott ($r=0,75$, $p<0,05$) (**9. ábra**), majd - csökkenő sorrendben - a LS és a Metavir ($r=0,61$, $p<0,05$) (**10. ábra**), a LS és DMA ($r=0,47$, $p<0,05$) (**11. ábra**), a LS és az APRI ($r=0,35$, $p<0,05$), valamint a Metavir és az APRI ($r=0,24$ $p<0,05$) következett.

Fibrosis stádium szerinti vizsgálat

Az előrehaladott fibrosis stádiumokat (F3- F4) együtt értékelve a LS és DMA adatok között kifejezettebb szignifikáns pozitív korrelációt találtunk ($r=0,55$, $p<0,05$), mint az összes esetet együtt vizsgálva ($r=0,47$, $p<0,05$)

A szövettani minta nagysága szerint

Portaszám szerint felosztottuk a vizsgált mintákat két csoportra: a 10 alatti portális mezőt tartalmazó mintákban a LS és DMA eredménye szignifikáns, de relative gyenge korrelációs értékeket mutatott ($p<0,05$ $r=0,36$), míg ≥ 10 portaszám esetén szignifikáns erős korreláció tapasztalható a LS és a DMA értékek között ($p<0,05$ $r=0,71$)

Előrehaladott fibrosis stádiumokban (F3-F4) mind a kevés (5-9), mind a több (≥ 10) portális mezőt tartalmazó mintákban egyaránt szignifikáns, erős pozitív korreláció volt a LS és a DMA mérési eredmények között ($p<0,05$ $r=0,55$) illetve ($p<0,05$ $r=0,68$), de itt is a nagyobb minták esetében volt az összefüggés kifejezettebb.

Nemek szerinti vizsgálat

Megvizsgáltuk külön a női és férfi mintákban a DMA és a Metavir kapcsolatát és mindkét nemben azonosan erős korrelációt kaptunk ($p<0,05$ $r= 0,76$) A LS és Metavir

közti korrelációs értékek is igen hasonlóak voltak (férfi: $p < 0,05$ $r = 0,66$ nők: $p < 0,05$ $r = 0,58$)

Nagyobb különbség a LS és DMA összevetése esetén mutatkozott (férfi: $r = 0,65$, nők: $r = 0,34$)

A zsír szerepének vizsgálata

A steatosist nem, vagy csak enyhe fokban mutató (Garde 0-1) és a jelentős fokú steatosisos (Grade 2-3) mintákban a fibrosis mértékét vizsgálva nem találtunk érdemi eltérést a különböző módszerek közötti korrelációkban: DMA és Metavir között ($p < 0,05$ $r = 0,73$, illetve $p < 0,05$ $r = 0,79$), LS és Metavir között ($p < 0,05$ $r = 0,6$, illetve $p < 0,05$ $r = 0,68$), valamint a LS és DMA között ($p < 0,05$ $r = 0,42$, illetve $p < 0,05$ $r = 0,61$).

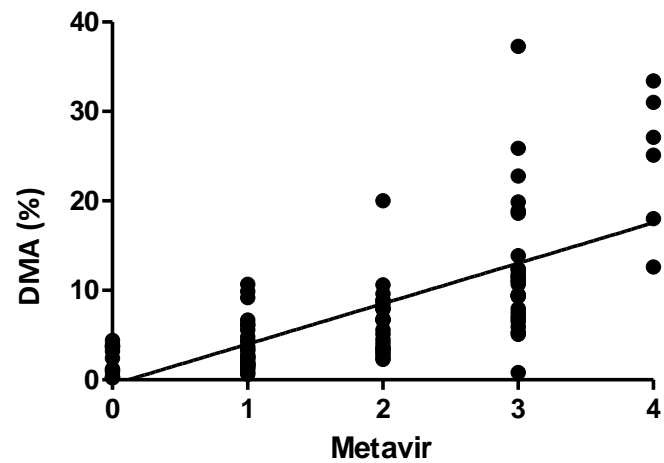
HCV-s betegek

53 CHC- ben szenvedő beteg mintáit külön is elemeztük. A legerősebb szignifikáns korrelációt a LS-Metavir között észleltük ($p < 0,05$ $r = 0,64$) és azonos szinten korrelált az LS-DMA és a LS- APRI ($p < 0,05$ $r = 0,48$).

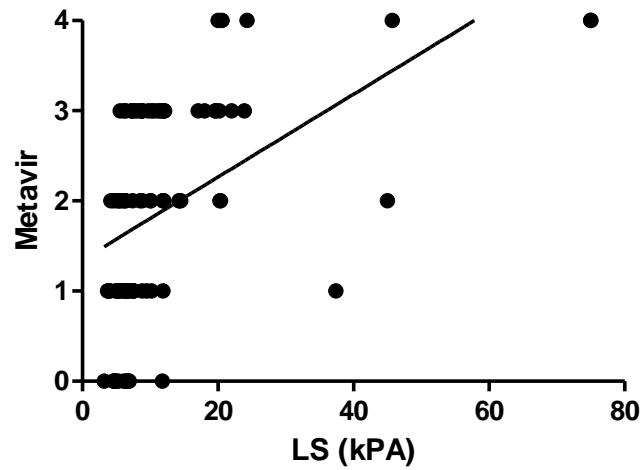
HAI szerinti vizsgálat

A CHC-ben szenvedő betegek közel felének (24 beteg) a szövettani aktivitási indexe mérsékelt vagy annál súlyosabb aktivitást mutatott ($HAI > 6$). Vizsgáltuk, hogy a 6 vagy az alatti és 6 feletti csoportban hogyan alakulnak a fibrosis mérési módszerek összefüggései. Mindkét csoportban azonos mértékben korrelált a DMA és a Metavir ($p < 0,05$ $r = 0,75$)

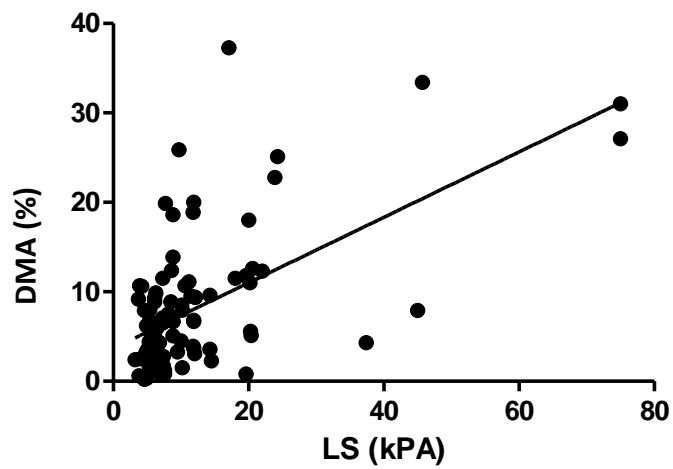
A LS-Metavir összefüggései sem mutattak lényeges különbséget mérsékeltebb, vagy kifejezett gyulladásos aktivitás esetén 6 alatti csoportban: $p < 0,05$ $r = 0,50$; 6 felettiben: $p < 0,05$ $r = 0,64$)



9. ábra Legerősebb kapcsolat a Metavir és DMA között volt ($r=0,75$, $p<0,05$)



10. ábra LS és a Metavir közötti kapcsolat ($r=0,61$, $p<0,05$)



11. ábra LS és a DMA összefüggése ($r=0,47$, $p<0,05$)

4.2. Micro-RNS vizsgálat eredményei

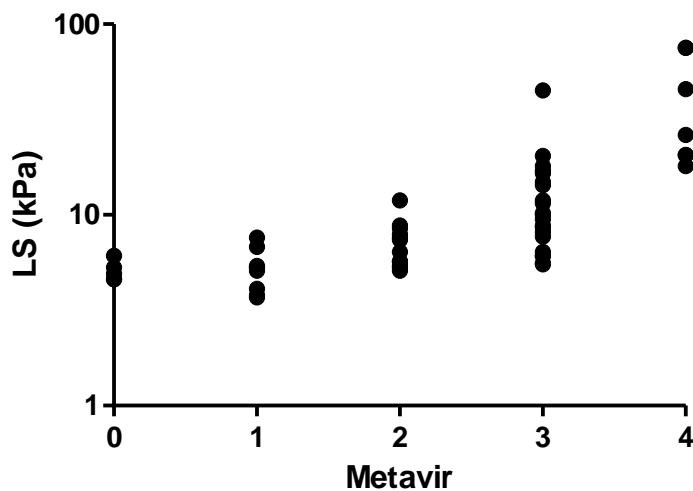
Ötvenkét esetben végeztük el a micro-RNS-ek relatív expressziójának meghatározását quantitativ valós idejű PCR-val (35 nő, 17 férfi életkoruk:15-67 átlag:45,18 év) (3. táblázat).

3. táblázat Klinikopatológiai adatok a molekuláris vizsgálat során

Etiológiai csoportok	esetszám	etiológiai alcsoportok	Fibrosis std. (METAVIR)	LS (KPa)	ALT (U/l)
Autoimmun	19	AIH (8) [*] PBC (6) PSC (2) AIH/PBC (2) AIH/PSC (1)	F0 (1) [*] F1 (3) F2 (4) F3 (9) F4 (2)	6.1 5.3-7.6 5.1-8.8 5.5-17.1 20.6-45.7	452 20-904 20-368 17-558 26-83
Chronicus vírus	24	HCV (22) HBV (2)	F0 (3) F1 (4) F2 (4) F3 (11) F4 (2)	4.6-5.3 3.8-6.8 5.4-7.6 5.6-20.4 18-26.3	14-125 12-35 20-88 12-257 60-108
vegyes	9	ALD (1) NAFLD (2) cryptogen (6)	F0 (1) F1 (2) F2 (3) F3 (1) F4 (2)	4.9 3.7-4.1 5.3-11.9 45 75	71 252-272 13-101 12 23-32
Összes	52	—	F0 (5) F1 (9) F2 (11) F3 (21) F4 (6)	4.6-6.1 3.7-7.6 5.1-11.9 5.5-45 18-75	14-452 12-904 13-368 12-558 23-108

A TE és Metavir közötti összefüggés vizsgálatának eredménye

A microRNS vizsgálatba bevont beteg alcsoport esetében a szövettani elemzés során megállapított fibrosis stádium (Metavir) és a LS értékek között egyértelmű és erős pozitív korrelációt találtunk ($r=0,8$ $p<0,0001$) (**12. ábra**)

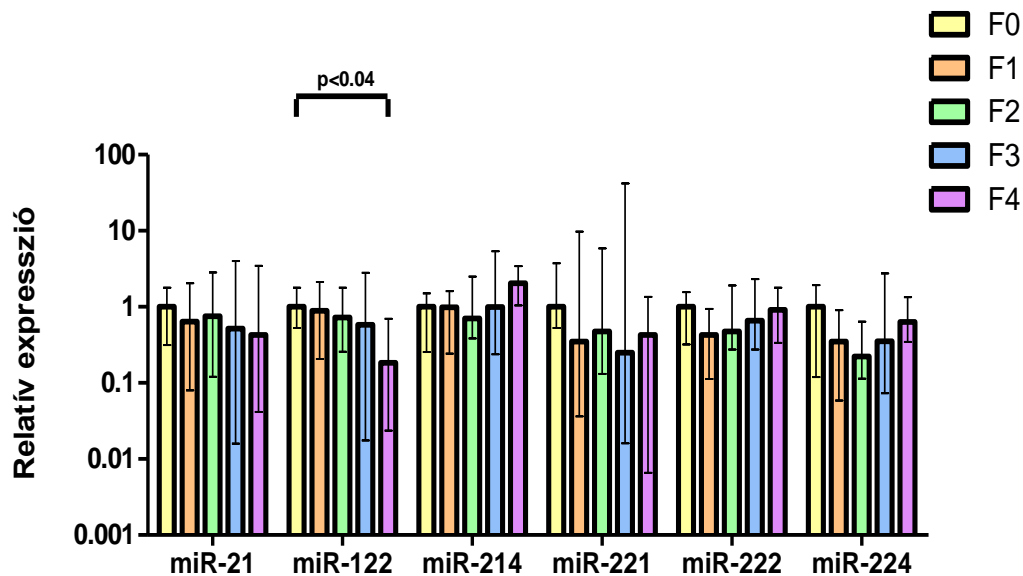


12. ábra Metavir score és a LS értékek közötti egyértelmű pozitív korreláció ($r=0,8$; $p<0,0001$)

A miR expresszió összefüggése a Metavir értékkel

F0 stádiummal összehasonlítva általában csökkent miRNS expressziót figyeltünk meg az F1-F4 stádiumokban, melyek statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak, kivéve a miR-122 esetében, ahol is F4-ben szignifikánsan alacsonyabb expressziót detektáltunk az F0-hoz képest ($p<0,04$). Továbbá különbséget találtunk a miR-122 esetén F1-F4 ($p=0,06$) és F2-F4 ($p=0,07$) között is, amelyek a statisztikai határ közelében voltak, de azt nem érték el. (**13. ábra**)

13. ábra

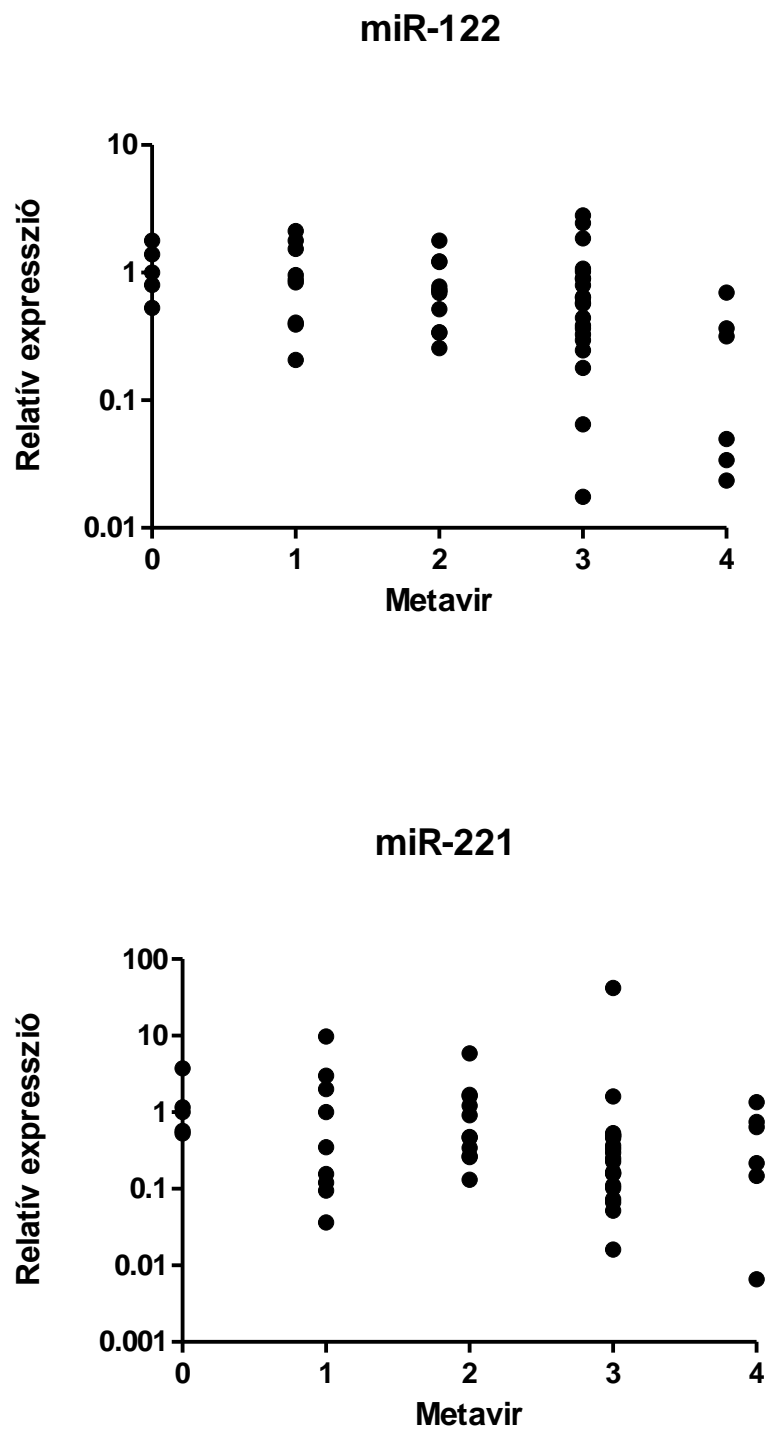


13. ábra. A miR expressziós mintázat F1-F4 stádiumokban az F0 állapothoz viszonyítva. Az oszlopok magassága a medián értéket mutatja, míg a függőleges vonalak a tartományban a legmagasabb, illetve a legalacsonyabb értékeket jelzik.

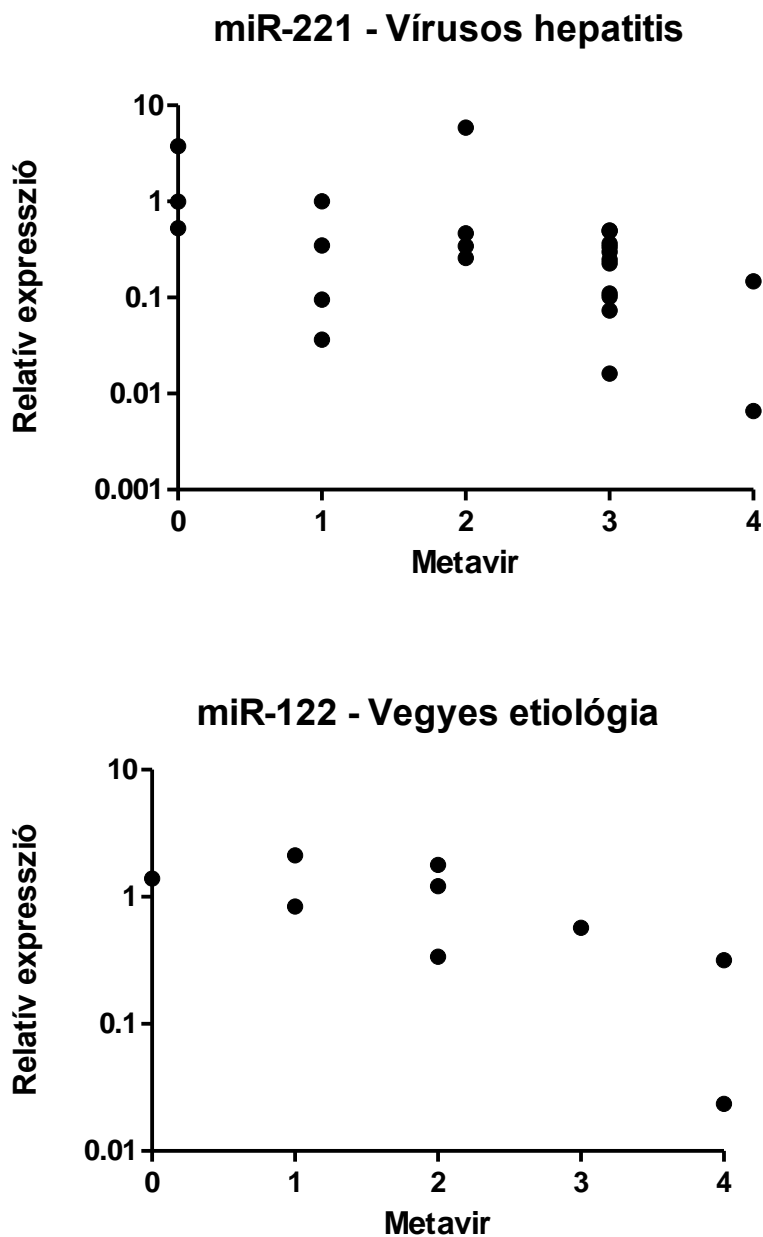
A különböző etiológiai csoportok tekintetében szignifikánsan eltérő miR expressziós mintázatot nem találtunk, azonban a miR-122, miR-214, miR-222 és a miR-224 esetében a mintázat hasonlított az autoimmun és vírus hepatitises csoportokban, valamint a miR-21 tekintetében a vegyes etiológiájú, autoimmun és vírushepatitiszes csoportokban.

A miR-122 és miR-221 expresszió negatív korrelációját találtuk a Metavir stádiumokkal ($p < 0,002$ és $p < 0,03$) (14/a ábra), valamint etiológia szerint a miR-221 negatív korrelációt mutatott a vírushepatitiszes csoportban ($p < 0,009$), a miR-122 pedig a vegyes etiológiájú csoportban ($p < 0,02$) (14/b. ábra).

14/a ábra



14/b ábra



14. ábra Korreláció a Metavir és miR expresszió között

a) Az összes mintát vizsgálva a miR-122 ($r = -0,4$, $p < 0,002$) és a miR-221 ($r = -0,3$, $p < 0,03$) negatívan korrelált a fibrosis stádiummal.

b) Az etiológiai alcsoportokban tapasztalt korreláció: a miR-221 ($r = -0,5$, $p < 0,009$) a chronicus virus hepatitisben, míg a miR-122 ($r = -0,8$, $p < 0,02$) a vegyes etiológiájú alcsoportban mutatott negatív korrelációt a fibrosis stádiummal.

A miR expresszió és a transiens elasztográfia összefüggései

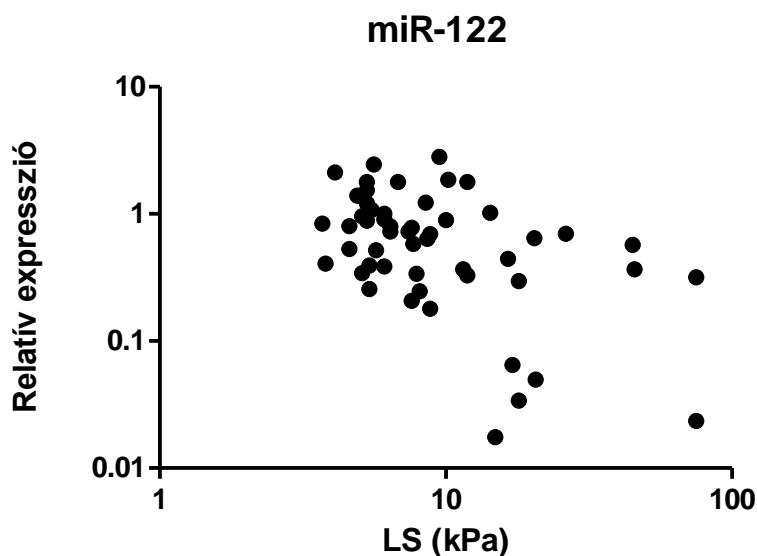
A non-invazív módon mért fibrosis értékekkel két miR mutatott korrelációt a miR-122 esetében negatív ($p < 0,002$), míg a miR-224 esetében pozitív ($p < 0,004$) korrelációt kaptunk. Az alcsoportok közül a vegyes etiológiájú csoportnál tapasztaltunk negatív korrelációt a miR-122 expressziójával ($p < 0,05$), míg az autoimmun és a vírushepatitis alcsoportokban a tendencia megfigyelhető ugyan, de a statisztikailag szignifikáns mértéket nem érte el (4. táblázat, 15. ábra).

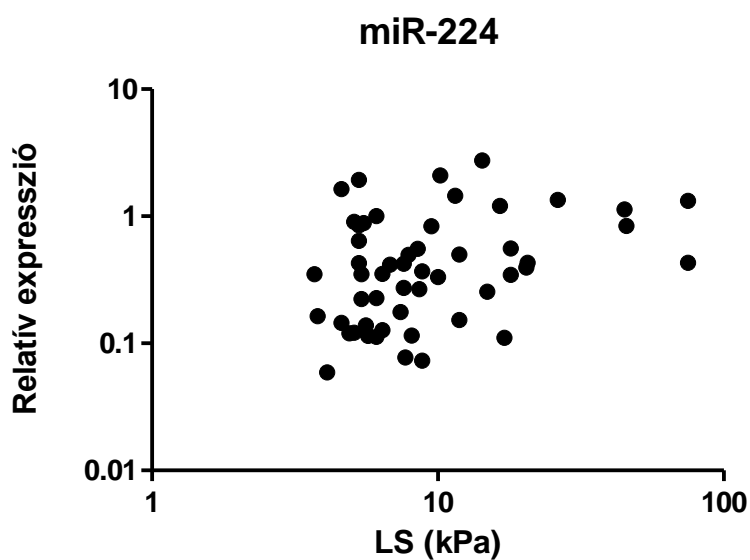
4. táblázat A fibrosis stadium a liver stiffness és az ALT összefüggései az etiológiai alcsoportokban

miR	Összes minta (n=52)	Etiológiai alcsoportok		
		Autoimmun (n=19)	Vírus (n=24)	Vegyes (n=9)
<i>Fibrosis stage</i>				
miR-122	$r = -0.4, p < 0.002$	$r = -0.3, p < 0.2$	$r = -0.3, p < 0.1$	$r = -0.8, p < 0.02$
miR-221	$r = -0.3, p < 0.03$	$r = -0.3, p < 0.2$	$r = -0.5, p < 0.009$	$r = -0.2, p < 0.4$
<i>LS</i>				
miR-122	$r = -0.4, p < 0.002$	$r = -0.4, p < 0.09$	$r = -0.2, p < 0.3$	$r = -0.7, p < 0.05$
miR-224	$r = 0.3, p < 0.04$	$r = 0.3, p < 0.2$	$r = 0.06, p < 0.7$	$r = 0.6, p < 0.07$
<i>ALT</i>				
miR-21	$r = 0.3, p < 0.04$	$r = 0.5, p < 0.03$	$r = 0.4, p < 0.09$	$r = -0.4, p < 0.3$

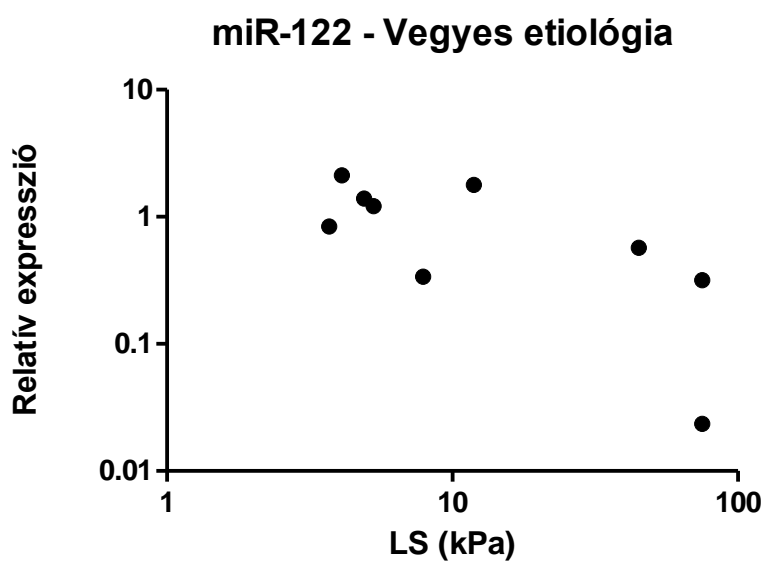
LS: liver stiffness, ALT: alanin aminotranszferáz

15/a ábra





15/b



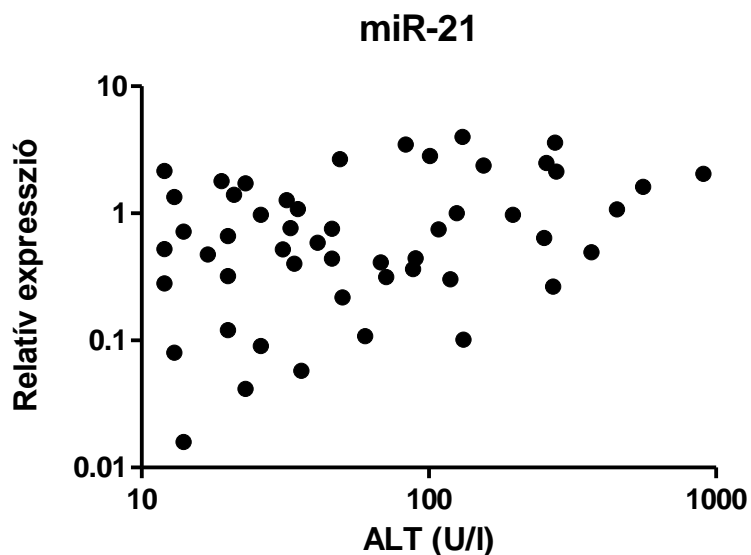
15. ábra. Korreláció a miR expresszió és a LS között

*a) Az összes mintát vizsgálva a miR-122 ($r = -0,4$, $p < 0,002$) negatívan, míg a miR-224 ($r = 0,3$, $p < 0,04$) pozitívan korrelált a fibrosis értékekkel. **b)** A miR-122 ($r = -0,7$, $p < 0,05$) szintén negatív korrelációt mutatott a vegyes etiológiájú alcsoportban.*

A miR és ALT szintek összefüggése

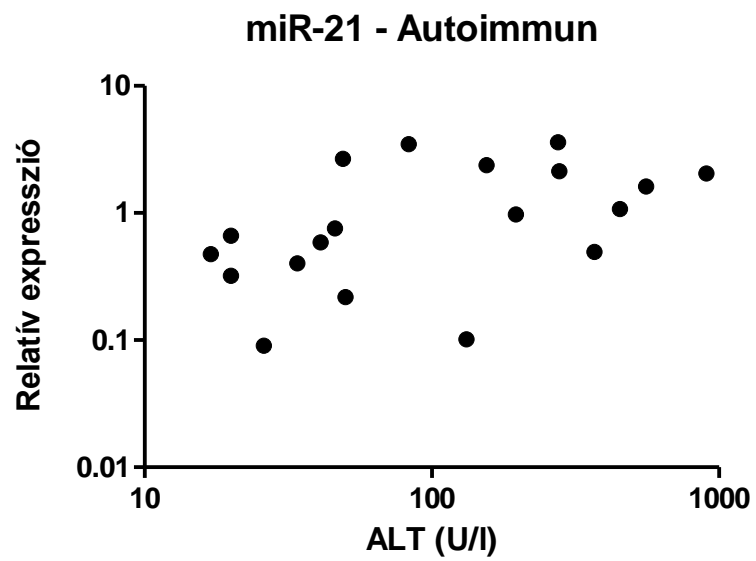
A miR-21 esetében észleltünk pozitív korrelációt a serum ALT értékkel ($p < 0,04$), mely hasonlóan megfigyelhető volt az autoimmun alcsoportban is ($p < 0,03$), szemben a másik két alcsoporttal (16. ábra).

16./a ábra



16./a ábra. Korreláció a miR expresszió és a szérum ALT értékek között. Az összes mintát vizsgálva a miR-21 mutatott pozitív korrelációt ($r=0,3$, $p < 0,04$) az ALT értékkel,

16/b ábra



16./b ábra. Korreláció a miR expresszió és a szérum ALT értékek között

b) Az etiológiai alcsoportokban vizsgálva ez a kapcsolat csak az autoimmun alcsoportban bizonyult szignifikánsnak ($r=0,5$, $p<0,03$)

5. Megbeszélés

5.1. A digitális morphometriai mérések értékelése

A májfibrosis pontos mértékének meghatározása fontos tényező az alapbetegség progressziójának és a terápia hatékonyságának megítélésében (Dahab és mtsai. 2004).

A számítógépes morphometriai analysis módszere több évtizedes múltra tekint vissza. A technika fejlődésével, újabb softverek alkalmazásával, magas felbontású metszet scanner-ekkel lehetőség nyílt arra, hogy a fibrosis mértékének meghatározásában is jól használható eszköz legyen (Wright és mtsai. 2003, Dahab és mtsai. 2004, Goodman és mtsai. 2009, Huss és mtsai. 2010).

Maduli és munkatársai 2002-ben publikált munkájában két független patológus vizsgálta HCV-s betegek terápia előtti és utáni biopsziás mintáit, és azt tapasztalták, hogy a morphometriai módszerrel a fibrosis változásainak iránya jól meghatározható (Maduli és mtsai. 2002). Ugyanerre az eredményre jutott Arima és munkacsoportja is 2004-ben, 25 HCV-s beteget vizsgáltak INF terápia előtt és után. A digitális morphometriai analysis még a cirrhotikus betegekben is százalékosan mérhető fibrosis regressziót mutatott, amely szemi-quantitatív módszerrel nem volt detektálható (Arima és mtsai. 2004).

Számos cikk jelent meg az irodalomban arról, hogy a különböző szemi-quantitatív score-okkal (Knodell, Ishak, Metavir) összevetve a különböző quantitatív morphometriás mérési módszereket, erős összefüggés tapasztalható (Pilette és mtsai. 1998, O'Brien és mtsai. 2000, Wright és mtsai. 2003, Friedenberg és mtsai. 2005).

A mi vizsgálatunkban mind az egész beteganyagot, mind a HCV-s betegcsoportot illetően a digitális morphometriai mérések adatai korreláltak legerősebben a Metavir értékeivel, és igen jól korreláltak a LS értékekkel is.

A vizsgálatban kevés portális mezőt tartalmazó mintákat külön is értékeltünk, ez a tény – a sampling error lehetősége miatt - nyilvánvalóan kedvezőtlenül befolyásolhatta

a meghatározás pontosságát. Ezt támasztja alá, hogy a 10 vagy ennél több portális mezőt tartalmazó minták értékelésekor a digitális morphometriai mérések még jobb korrelációt mutattak a LS-szel. Különösen tehát a kis, kevés portális mezőt tartalmazó minták esetében jelenthet segítséget a DMA és/vagy a TE a fibrosis mértékének pontosabb megítélésében.

A legtöbb irodalmi adattal egyezően mi is azt tapasztaltuk, hogy a súlyos fokú fibrosisban illetve cirrhosisban használható leginkább a morphometriai módszer a diagnózis pontosítására és a TE szenzitivitása is e csoportban a legjobb (O'Brien és mtsai. 2000, Lazzarini és mtsai. 2005, Ziol és mtsai. 2009).

Vizsgáltuk, hogy a két különböző nemben van-e eltérés a vizsgált paraméterek összefüggéseiben, de csupán a LS és morphometria viszonyában észleltünk számottevő korrelációs különbséget. A nők esetében a korreláció gyengébb, amit magyarázhat, hogy a nőknél a máj rigiditása eltér a férfiakétól. Kimutatták, hogy az ECM sűrűségéből adódó különbségek miatt, a nők mája puhább a férfiakénál (Cho és mtsai. 2011).

Más irodalmi adatok szerint patkány kísérletekkel igazolt, hogy az ovarialis hormonok gátolják nőkben a HSC sejtek általi ECM képzését, mely szintén magyarázhatja a nemek közötti különbséget (Yasuda és mtsai. 1999).

Bár az irodalmi adatok többsége szerint a TE során a steatosis jelenléte, illetve mértéke nem befolyásolja a fibrosis meghatározás pontosságát, ennek ellentmondó eredményt is közöltek. Arena és munkacsoportja 150 CHC-s betegen vizsgálta, hogy a steatosis jelenléte hogyan befolyásolja a TE által nyújtott eredményeket és azt találta, hogy a fibrosis megítélése a zsír jelenlététől független (Arena és mtsai. 2008). Ezzel szemben Fraquelli és mtsai azt tapasztalták, hogy mérsékelt és súlyos fokú steatosis jelenlétekor a TE fals pozitív eredményt ad, melynek vélhető oka szerintük, hogy a májsejtekben meglévő zsír interakcióba kerül az alacsony frekvenciájú vibrációval, amit a TE működése során kibocsájt, és növeli a mérésakor a zaj megjelenését (Fraquelli és mtsai. 2007).

Munkánkban sem a steatosis jelenléte, sem a mennyisége nem befolyásolta – egyik alkalmazott vizsgálómódszer esetében sem - a fibrosis stádium megítélését.

Az APRI értékek összevetése során szignifikáns, de gyenge korrelációt találtunk a LS értékével és a Metavir score-ral is, úgy az összes betegen vizsgálva, mind a HCV-s csoportban. Mindkét esetben a LS –APRI érték mutatott erősebb korrelációt. Poynard és munkatársai 2011-ben végeztek meta-analysist különböző non-invazív markerek (Fibro-test, APRI, Fib-4, LS) használhatóságának és megbízhatóságának vizsgálatára chronicus hepatitises betegeken (HCV, HBV, ALD). A Fibro-test megbízhatósága bizonyult a legmagasabbnak, de az APRI is szignifikáns prognosztikai értékű volt. Mindemellett a szerzők úgy értékelik, hogy transzamináz értéket (AST, ALT) tartalmazó markerek (APRI, Fib- 4) azért kevésbé megbízhatóak, mert ezek értékét befolyásolja a necroinflammációs aktivitás, és ez a fibrosis megítélésének pontosságát ronthatja (Poynard és mtsai. 2011).

Az irodalmi adatokkal egyezően, a mi vizsgálatunkban is az APRI értéke volt a legkevésbé megbízható, ennek ellenére használatát indokolja egyszerűsége, olcsósága, és így széles körű alkalmazhatósága.

5.2. A micro-RNS vizsgálatok eredményeinek értékelése

A fibrosis meghatározás jelenlegi formái és annak korlátai arra sarkallják a kutatókat, hogy új megközelítési módokat dolgozzanak ki. Általános igény, hogy olyan indikátort találjunk, akár molekuláris szinten, amely előre jelezheti a betegség progresszióját. Ilyen új megközelítés lehet a microRNS-ek diagnosztikus alkalmazása fibrosisban, mivel az irodalomban leírt megváltozott expressziójuk májbetegségekben, fibrosisban és a máj karcinogenezis folyamatában erre lehetőséget adhat (Borel és mtsai. 2012, He és mtsai. 2012, Karakatsanis és mtsai. 2013, Szabo és Bala 2013).

Eddig a miR-ek expressziós változásait leginkább HCV fertőzöttek mintáiban vizsgálták, mi jelen munkánkban különböző etiológiájú chronicus májbeteggek mintáira is kiterjesztettük vizsgálatukat.

A miR-122 expressziós mintázata mutatott szignifikáns negatív korrelációt F0 és F4 stádiumok között a Metavir score, valamint a LS értékekkel. Eredményeink összhangban vannak azokkal a korábbi tanulmányokkal, melyekben hasonlóan negatív korrelációt találtak chronicus HCV fertőzöttek mintáiban illetve HCV talaján kialakult

cirrhosis és HCC vonatkozásában (Marquez és mtsai. 2010, Morita és mtsai. 2011, Borel és mtsai. 2012).

Néhány tanulmány NAFLD –ben is a miR-122 alulszabályozottságát írta le (Kerr és mtsai. 2011, Lakner és mtsai. 2011).

A fibrotikus mintákban a csökkenő miR-122 szintet úgy értelmezhetjük, hogy a normál hepatocyta aktivitást a gyulladás és a necrosis akadályozza, hiszen e miRNS szintje a szérumban gyakran emelkedik májbetegségekben. De az alacsony expresszió mögött egy fibrosis gátló hatás megszűnése is lehetséges. Egy nemrégiben megjelent tanulmányban leírják a miR-122 anti-fibrogenetikus hatását, amely a csillagsejtek proliferációjának gátlásában nyilvánult meg, és így a kollagén érés kulcsenzime, a P4HA1 termelődésének csökkenéséhez, és nem teljes kollagén éréshez vezetett (Li és mtsai. 2013).

A miR-122 a karcinogenezisre is negatív hatással van azáltal, hogy gátolja olyan fehérjék expresszióját, amelyek a sejtciklusban, differenciációban, proliferációban és apoptózisban vesznek részt (Boutz és mtsai. 2011).

Megfigyelték, hogy HCC-ben a miR-122 hiánya korrelál invázió és migrációs képességgel (Scisciani és mtsai. 2012).

HCV-vel kapcsolatos vizsgálatokban azt találták, hogy a miR-122 a virális RNS-hez kötődve (két kötőhellyel is rendelkezik) védi azt az exonukleázok általi lebomlástól (Mortimer és Doudna 2013). Úgy tűnik azonban, hogy ez a védelem a HCV fertőzőképessége szempontjából nem játszik kulcsszerepet. Feltételezhetően további, eddig még ismeretlen funkciója is lehet a vírus életciklusában.

Mindezeket összevetve a miR-122 alulszabályozottsága a májkárosodás és a fibrosis progresszió érzékeny jelzőjének tűnik.

HCC-ben a miR-221, miR-224 és miR-21 túlzott expressziója ismert. Ezek az oncomiR-ek olyan tumor-szupresszor gének expresszióját gátolják, mint pl. PTEN, p57 és p27, és így elősegítik a tumorsejtek proliferációját (Borel és mtsai. 2012, Karakatsanis és mtsai. 2013).

A miR-221 szintjének emelkedéséről számoltak be praeneoplasztikus léziókban, mint például HCV-indukálta cirrhosisban és NASH-es biosziákban (Karakatsanis és mtsai. 2013), valamint egerekben is, ahol a máj regenerációja során gyorsította a hepatocyták proliferációját in vivo és in vitro epidermális és hepatocytá növekedési faktor (EGF vagy HGF) jelenlétében azáltal, hogy elősegítette a gyorsabb S-fázisba lépést az osztódás során (Yuan és mtsai. 2013). Továbbá a mir 221 expressziója fokozódott előrehaladottabb fibrosis stádiumban és pozitívan korrelált az I típusú kollagén szintjével chronicus C hepatitisben és NASH-ben (Ogawa és mtsai. 2012). Ezzel szemben a mi vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns eltérést a miR221 expressziójában sőt az általunk vizsgált mintákban, a chronicus hepatitises csoportban is, a miR-221 expressziója és a fibrosis stádium között negatív korrelációt észleltünk. Ezt magyarázhatja az alkalmazott statisztikai módszerek eltérő volta csakúgy, mint az egyes fibrosis stádiumokba tartozó esetek számának különbözősége, továbbá a regeneráció mértékének valószínű eltérése. Másik lehetséges magyarázat lehet a DNS metilációs státusz különbözősége, mivel HCC-ben a miR-221 lókuszhypomethyláltságát figyelték meg, mely hozzájárul a miR-221 fokozott expressziójához (Fornari és mtsai. 2014).

A miR-224 vizsgálata során azt találták, hogy az AKT jelátviteli út aktiválása révén elősegíti a proliferációt, a migrációt, és az inváziót HCC-ben, és így jelentős szerepe van a carcinogenesis és a tumor progresszió folyamatában (Ma és mtsai. 2012).

A vizsgálatunkban észlelt pozitív korreláció a miR-224 expressziója és a LS érték között, megfelel azon irodalmi adatoknak, melyek szerint a miRNS expressziója a fibrosis előrehaladtával fokozódik (Estebaud és mtsai. 2011). Az emelkedett expressziós szint utalhat arra, hogy a miR változás megjelenhet a malignus transzformációt megelőzően, annak korai jeleként (Ciesla és mtsai. 2011). Emelkedett miR-224 szintet figyeltek meg steatosisban és steatotikus chronicus hepatitis C-s mintákban (Lendvai és mtsai. 2014).

Vizsgálatunk során nem találtunk kapcsolatot a miR-21 expresszió változása és a fibrosis súlyossága között, viszont pozitív korreláció mutatkozott a serum ALT szint és a miR-21 között, mely felveti annak lehetőségét, hogy a miR-21 a necroinflammáció

mértékének indikátora lehet (Marquez és mtsai. 2010). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a miR-21 csökkenti a fibrogenesisel kapcsolatos egyik tumorszupresszor gén a SMAD-7 szintjét, amely májkárosodás esetén a csillagsejtek aktiválását és fibrosist kiváltó TGF- β jelátviteli út negatív szabályozója (Marquez és mtsai. 2010, Noetel és mtsai. 2012). Ezen túl a miR-21 egy másik, a proliferációval kapcsolatos tumorszupresszor gén, a PTEN negatív regulátora, mely az AKT jelátviteli út inhibitora (Wei és mtsai. 2013). Ezek alapján necroinflammáció intenzitásával arányosan fokozott miR-21 expresszió a SMAD-7 gátlása révén a TGF- β jelátviteli út közvetítésével fokozhatja a fibrogenesist.

6. Következtetések

Eredményeink alapján:

1. Hazánkban először készült ilyen esetszámú vizsgálat, mely digitális morphometriai analysist is felhasznált az invazív és non-invazív fibrosis markerek összehasonlítására különböző etiológiájú chronicus májbetegségekben.
2. A digitális morphometriai analysissel (DMA) mért értékek igen jól korreláltak a Metavir score-ral és a non-invazív fibrosis meghatározási módszerek eredményeivel, elsősorban a LS értékkel. Ennek alapján a DMA hasznos kiegészítője lehet a histopathologiai fibrosis stádium meghatározásnak.
3. A non-invazív fibrosis stádium meghatározás módszerei, így az LS és az APRI is igen jó korrelációt mutattak a histopathologiai módszerekkel. Az LS és APRI közül az előbbi mutatott erősebb korrelációt.
4. Mind a DMA, mind a non-invazív technikák pontossága nőtt az előrehaladottabb fibrosis stádiumokban.
5. A biopsziás minta nagyságának növekedésével az invazív és non-invazív technikákkal mért fibrosis meghatározás közötti korreláció szorosabb volt.
6. A steatosis jelenléte és mértéke, a nem, a histologiailag meghatározott gyulladásos aktivitás (HAI) mértéke, a DMA, illetve a non-invazív fibrosis meghatározások eredményét nem befolyásolta.
7. Először írtuk le a miR-122 csökkenését a fibrosis függvényében eltérő etiológiájú chronicus májbetegségekben. Három - a hepatocarcinogenesisben is szerepet játszó - microRNS (miR-122, miR-221 és a miR-224) mutatott összefüggést- etiológiától függetlenül- a Metavir és/ vagy a LS értékekkel.

Közlük a miR-122 bizonyult a jövőben leginkább használható molekulának a fibrosis diagnosztika tekintetében.

8. A gyulladásos aktivitás mértékére utaló ALT értékkel a miR- 21 mutatott pozitív összefüggést.
9. A különböző etiológiai csoportok tekintetében szignifikánsan eltérő miR expressziós mintázatot nem találtunk.

7. Összefoglalás

Idült diffúz májbetegségekben a fibrosis mértékének pontos meghatározásának alapvető jelentősége van a prognózis megítélésében, a terápia indikációjának felállításában, és a kezelés módjának, időtartamának megválasztásában (pl. chronicus B és C hepatitis), valamint a kezelés hatásosságának megítélésében. Ez indokolja a histológiai módszerek pontosításának igényét, valamint a non-invazív módszerek növekvő térhódítását, melyet utóbbiak lényegesen kedvezőbb cost/benefit és risk/benefit aránya magyaráz. Egyre szélesebb körű alkalmazásukhoz ugyanakkor elengedhetetlenül szükséges előnyeik és hátrányaik, szenzitivitásuk és specificitásuk pontos feltérképezése.

Vizsgálatunkban a chronicus májbeteggek májbiopsziás mintáiban a Metavir score-al igen jól korrelált a digitalis morphometriai analysis eredménye és hasonlóan meggyőző, pozitív összefüggést észleltünk a transiens elasztográfia során nyert liver stiffness értékekkel is. A laboratóriumi eredményekből képzett indirekt fibrosis marker – APRI - valamivel gyengébb korrelációt mutatott. Munkánkban a hepatokarcinogenezisben már ismertén szerepet játszó microRNS-ek intrahepaticus expresszióját vizsgáltuk a fibrosis függvényében. A miR-122 negatív korrelációt mutatott a fibrosis értékekkel és a LS értékeivel is, míg a miR-224 esetében az LS esetében volt szignifikáns a pozitív korreláció.

A miR-21 a fibrosissal nem mutatott összefüggést, de a szérum ALT értékekkel pozitív szignifikáns összefüggése volt, mely az irodalmi adatokkal egyező, és utal a miR-21 és a necroinflammáció összefüggésére.

A fibrosis diagnosztika finomításának további eszközei lehetnek a jövőben a miR-122 és a miR-224 expressziójának a vizsgálata. Hasonlóan számos más élettani és patológias folyamathoz, e molekulák fibrogenesisben betöltött szerepének pontos megismerése is további vizsgálatokat igényel.

7. Summary

The evaluation of liver fibrosis is essential for the evaluation of the prognosis of chronic liver diseases. Initiation of the therapy as well as the method and the duration of the treatment may depend on the stage of fibrosis. Furthermore, change in the degree of liver fibrosis is an important factor to assess efficacy of the treatment and prognosis in chronic liver diseases.

Clinical relevance of staging fibrosis emphasizes the need of improvement of histological methods, as well as of widely spread non-invasive methods, which latter known to provide much better cost/benefit and risk/benefit ratios. However, advantages and disadvantages, sensitivity and specificity of these new non-invasive methods require further investigations. According to our results, Metavir score correlates very well with the results of digital morphometry, and similarly convincing positive correlation was observed between Metavir scores and liver stiffness values. The correlation between APRI - an indirect fibrosis marker calculated from AST and platelet count values – and Metavir scores was weaker.

We examined the potential connection between the fibrosis stage and the expressions of different microRNAs, known to have a regulatory role in hepatocarcinogenesis.

We found negative correlation between the expression of miR-122 and fibrosis stages, as well as between the expression of miR-122 and liver stiffness values; while positive correlation was demonstrated between the expression of miR-224 and liver stiffness values. There was no correlation between the expression of miR-21 and the extent of fibrosis, but – in accordance with literature data – significant positive correlation was found between the expression of miR-21 and ALT levels. This observation indicates a connection between miR-21 expression and necroinflammation. Micro-RNAs miR-122 and miR-224 may prove to have further diagnostic value in refinement of histological measurement of liver fibrosis. Exploration the exact role of these molecules in fibrogenesis – as well as in many other physiological and pathological processes - requires further investigations.

Irodalomjegyzék

Afdhal NH (2004) Biopsy or biomarkers: Is there a gold standard for diagnosis of liver fibrosis? *Clinical Chemistry*, 50: 1299-1300.

Ahmad W, Ijaz B, Gull S, Asad S, Khaliq S, Jahan S, Sarwar MT, Kausar H, Sumrin A, Shahid I, Hassan S (2011) A brief review on molecular, genetic and imaging techniques for HCV fibrosis evaluation. *Virology*, 8: 53.

Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Popper H (1978) Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, 1: 459-463.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64: 5245-5250.

Arena U, Vizzutti F, Abraldes JG, Corti G, Stasi C, Moscarella S, Milani S, Lorefice E, Petrarca A, Romanelli RG, Laffi G, Bosch J, Marra F, Pinzani M (2008) Reliability of transient elastography for the diagnosis of advanced fibrosis in chronic hepatitis C. *Gut*, 57: 1288-1293.

Arima M, Terao H, Kashima K, Arita T, Nasu M, Nishizono A (2004) Regression of liver fibrosis in cases of chronic liver disease type C: Quantitative evaluation by using computed image analysis. *Internal Medicine*, 43: 902-910.

Badra G, Lotfy M, El-Refaie A, Obada M, Abdelmonem E, Kandeel S, Fathy A (2010) Significance of serum matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in chronic hepatitis C patients. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 57: 29-42.

Bala S, Marcos M, Szabo G (2009) Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol*, 15: 5633-5640.

Baranova A, Lal P, Bircerdinc A, Younossi ZM (2011) Non-invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol*, 11: 91.

Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C (1997) Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 1200-1205.

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.

Bihrer V, Friedrich-Rust M, Kronenberger B, Forestier N, Haupenthal J, Shi Y, Peveling-Oberhag J, Radeke HH, Sarrazin C, Herrmann E, Zeuzem S, Waidmann O, Piiper A (2011) Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*, 106: 1663-1669.

Bonacini M, Hadi G, Govindarajan S, Lindsay KL (1997) Utility of a discriminant score for diagnosing advanced fibrosis or cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*, 92: 1302-1304.

Borel F, Konstantinova P, Jansen PLM (2012) Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 56: 1371-1383.

Bortolotti F, Guido M (2007) Reversal of liver cirrhosis: a desirable clinical outcome and its pathogenic background. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 44: 401-406.

Boutz DR, Collins PJ, Suresh U, Lu M, Ramirez CM, Fernandez-Hernando C, Huang Y, Abreu RdS, Le S-Y, Shapiro BA, Liu AM, Luk JM, Aldred SF, Trinklein ND, Marcotte EM, Penalva LOF (2011) Two-tiered Approach Identifies a Network of Cancer and Liver Disease-related Genes Regulated by miR-122. *Journal of Biological Chemistry*, 286: 18066-18078.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR (1999) Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *American Journal of Gastroenterology*, 94: 2467-2474.

Cales P, Laine F, Boursier J, Deugnier Y, Moal V, Oberti F, Hunault G, Rousselet MC, Hubert I, Laafi J, Ducluzeaux PH, Lunel F (2009) Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD. *J Hepatol*, 50: 165-173.

Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136: 642-655.

Cedrone A, Covino M, Caturelli E, Pompili M, Lorenzelli G, Villani MR, Valle D, Sperandeo M, Rapaccini GL, Gasbarrini G (2000) Utility of alpha-fetoprotein (AFP) in the screening of patients with virus-related chronic liver disease: does different viral etiology influence AFP levels in HCC? A study in 350 western patients. *Hepatogastroenterology*, 47: 1654-1658.

Cho HJ, Seo YS, Lee KG, Hyun JJ, An H, Keum B, Kim JH, Yim HJ, Jeon YT, Lee HS, Chun HJ, Um SH, Kim CD, Ryu HS (2011) Serum aminotransferase levels instead of etiology affects the accuracy of transient elastography in chronic viral hepatitis patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26: 492-500.

Cho WCS (2010) MicroRNAs: Potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42: 1273-1281.

Ciesla M, Skrzypek K, Kozakowska M, Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J (2011) MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401: 2051-2061.

Corpechot C, El Naggar A, Poujol-Robert A, Ziol M, Wendum D, Chazouilleres O, de Ledinghen V, Dhumeaux D, Marcellin P, Beaugrand M, Poupon R (2006) Assessment of biliary fibrosis by transient elastography in patients with PBC and PSC. *Hepatology*, 43: 1118-1124.

Dahab GM, Kheriza MM, El-Beltagi HM, Fouda AMM, El-Din OAS (2004) Digital quantification of fibrosis in liver biopsy sections: Description of a new method by Photoshop softver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 19: 78-85.

De Groote J, Desmet VJ, Gedigk P, Korb G, Popper H, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H, Uehlinger E (1968) A classification of chronic hepatitis. *Lancet*, 2: 626-628.

de Ledinghen V, Vergniol J, Foucher J, Merrouche W, le Bail B (2012) Non-invasive diagnosis of liver steatosis using controlled attenuation parameter (CAP) and transient elastography. *Liver Int*, 32: 911-918.

Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ (1994) Classification of Chronic Hepatitis - Diagnosis, Grading and Staging. *Hepatology*, 19: 1513-1520.

Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE (2008) Evaluation and validation of total RNA extraction methods for MicroRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 10: 203-211.

Estebaud E, Bieche I, Lapalus M, De Muynck S, Lada O, Martinot-Peignoux M, Duces A, ., Valla D, Bedossa P, Marcellin P, Vidaud M, Asselah T (2011) Differential liver minRNAS expression in chronic hepatitis C patients at early stages of liver fibrosis. *J Hepatol*, 54: S315.

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 446: 801-805.

Fares N, Peron JM (2013) [Epidemiology, natural history, and risk factors of hepatocellular carcinoma]. *Rev Prat*, 63: 216-217, 220-212.

Fornari F, Milazzo M, Galassi M, Callegari E, Veronese A, Miyaaki H, Sabbioni S, Mantovani V, Marasco E, Chieco P, Negrini M, Bolondi L, Gramantieri L (2014) p53/mdm2 Feedback Loop Sustains miR-221 Expression and Dictates the Response to

Anticancer Treatments in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Cancer Research*, 12: 203-216.

Fowell AJ, Iredale JP (2006) Emerging therapies for liver fibrosis. *Digestive Diseases*, 24: 174-183.

Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, Colombo M (2007) Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut*, 56: 968-973.

Friedenberg MA, Miller L, Chung CY, Fleszler F, Banson FL, Thomas R, Swartz KP, Friedenberg FK (2005) Simplified method of hepatic fibrosis quantification: design of a new morphometric analysis application. *Liver International*, 25: 1156-1161.

Fukumoto I, Kikkawa N, Matsushita R, Kato M, Kurozumi A, Nishikawa R, Goto Y, Koshizuka K, Hanazawa T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N (2016) Tumor-suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218) concertedly suppressed metastasis-promoting LOXL2 in head and neck squamous cell carcinoma. *J Hum Genet*, 61: 109-118.

Giannini E, Risso D, Botta F, Chiarbonello B, Fasoli A, Malfatti F, Romagnoli P, Testa E, Ceppa P, Testa R (2003) Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase-alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Arch Intern Med*, 163: 218-224.

Gombas P (2000) Informational aspects of telepathology in routine surgical pathology. *Anal Cell Pathol*, 21: 141-147.

Gombas P, Skepper JN, Krenacs T, Molnar B, Hegyi L (2004) [Past, present and future of digital pathology]. *Orv Hetil*, 145: 433-443.

Goodman ZD, Stoddard AM, Bonkovsky HL, Fontana RJ, Ghany MG, Morgan TR, Wright EC, Brunt EM, Kleiner DE, Shiffmann ML, Everson GT, Lindsay KL, Dienstag

JL, Morishima C (2009) Fibrosis Progression in Chronic Hepatitis C: Morphometric Image Analysis in the HALT-C Trial. *Hepatology*, 50: 1738-1749.

Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM (2007) Biomarkers of liver fibrosis: Clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clinica Chimica Acta*, 381: 107-113.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 34: D140-144.

Guechot J, Lasnier E, Sturm N, Paris A, Zarski JP (2010) Automation of the Hepascore and validation as a biochemical index of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C from the ANRS HC EP 23 Fibrostar cohort. *Clin Chim Acta*, 411: 86-91.

Halfon P, Bourliere M, Penaranda G, Deydier R, Renou C, Botta-Fridlund D, Tran A, Portal I, Allemand I, Rosenthal-Allieri A, Ouzan D (2005) Accuracy of hyaluronic acid level for predicting liver fibrosis stages in patients with hepatitis C virus. *Comp Hepatol*, 4: 6.

Hall AR, Tsochatzis E, Morris R, Burroughs AK, Dhillon AP (2013) Sample size requirement for digital image analysis of collagen proportionate area in cirrhotic livers. *Histopathology*, 62: 421-430.

Haybaeck J, Zeller N, Heikenwalder M (2011) The parallel universe: microRNAs and their role in chronic hepatitis, liver tissue damage and hepatocarcinogenesis. *Swiss Medical Weekly*, 141.

He Y, Huang C, Zhang S-p, Sun X, Long X-r, Li J (2012) The potential of microRNAs in liver fibrosis. *Cellular Signalling*, 24: 2268-2272.

Horváth G (2008) A chronicus hepatitis B- vírusfertőzés korszerű kezelése. *LAM*, 18: 769-775.

Horvath G, David K (2004) [Iron storage disease]. *Orv Hetil*, 145: 1979-1984.

Horvath G, Halasz T, Makara M, Hunyady B (2015) [New era in the treatment of chronic hepatitis C - novel direct acting antivirals]. *Orv Hetil*, 156: 841-848.

Hu J, Xu Y, Hao J, Wang S, Li C, Meng S (2012) MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein & Cell*, 3: 364-371.

Huang Y, de Boer WB, Adams LA, MacQuillan G, Bulsara MK, Jeffrey GP (2014) Image analysis of liver biopsy samples measures fibrosis and predicts clinical outcome. *Journal of Hepatology*, 61: 22-27.

Hunyady B (2007) A szérum alanin-aminotranszferáz-értéke chronicus C-vírus hepatitisben. Mennyi a „normális”, és kit kezeljünk? *LAM*, 17: 283-287.

Huss S, Schmitz J, Goltz D, Fischer HP, Buttner R, Weiskirchen R (2010) Development and evaluation of an open source Delphi-based softver for morphometric quantification of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 3: 10.

Inagaki Y, Higashiyama R, Higashi K (2012) Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy. *J Gastroenterol Hepatol*, 27 Suppl 2: 85-88.

Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, Degroote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, Macsween RNM, Phillips MJ, Portmann BG, Poulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H (1995) Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis. *Journal of Hepatology*, 22: 696-699.

Islam S, Antonsson L, Westin J, Lagging M (2005) Cirrhosis in hepatitis C virus-infected patients can be excluded using an index of standard biochemical serum markers. *Scand J Gastroenterol*, 40: 867-872.

Jarmay K, Karacsony G, Ozsvar Z, Nagy I, Lonovics J, Schaff Z (2002) Assessment of histological features in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*, 49: 239-243.

Ji J, Zhang J, Huang G, Qian J, Wang X, Mei S (2009) Over-expressed microRNA-27a and 27b influence fat accumulation and cell proliferation during rat hepatic stellate cell activation. *Febs Letters*, 583: 759-766.

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309: 1577-1581.

Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D (2013) Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Molecular Carcinogenesis*, 52: 297-303.

Kerr TA, Korenblat KM, Davidson NO (2011) MicroRNAs and liver disease. *Translational Research*, 157: 241-252.

Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 376-385.

Koda M, Matunaga Y, Kawakami M, Kishimoto Y, Suou T, Murawaki Y (2007) FibroIndex, a practical index for predicting significant fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 45: 297-306.

Konate A, Reaud S, Quenemer E (2006) Liver stiffness measurement by transient elastography: predictive factors of accuracy and reproducibility. *J Hepatol*, 44: S195.

Kopper L, Schaff Z. *Patológia. Budapest, Medicina*. 2004

Korner T, Kropf J, Gressner AM (1996) Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: markers of progression with high prognostic value. *J Hepatol*, 25: 684-688.

Kwiecinski M, Noetel A, Elfimova N, Trebicka J, Schievenbusch S, Strack I, Molnar L, von Brandenstein M, Toex U, Nischt R, Coutelle O, Dienes HP, Odenthal M (2011) Hepatocyte Growth Factor (HGF) Inhibits Collagen I and IV Synthesis in Hepatic Stellate Cells by miRNA-29 Induction. *Plos One*, 6.

Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, Bauer B, Stauber RE (2005) Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 41: 1376-1382.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*, 12: 735-739.

Lakner AM, Bonkovsky HL, Schrum LW (2011) microRNAs: Fad or future of liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 17: 2536-2542.

Lazzarini AL, Levine RA, Ploutz-Snyder RJ, Sanderson SO (2005) Advances in digital quantification technique enhance discrimination between mild and advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Liver International*, 25: 1142-1149.

Lee UE, Friedman SL (2011) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology*, 25: 195-206.

Lendvai G, Jarmay K, Karacsony G, Halasz T, Kovalszky I, Baghy K, Wittmann T, Schaff Z, Kiss A (2014) Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies. *World Journal of Gastroenterology*, 20: 15343-15350.

Lewis JR, Mohanty SR (2010) Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*, 55: 560-578.

Li J, Ghazwani M, Zhang Y, Lu J, Li J, Fan J, Gandhi CR, Li S (2013) miR-122 regulates collagen production via targeting hepatic stellate cells and suppressing P4HA1 expression. *Journal of Hepatology*, 58: 522-528.

Li Y, Tan W, Neo TW, Aung MO, Wasser S, Lim SG, Tan TM (2009) Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, 100: 1234-1242.

Lim EJ, El Khobar K, Chin R, Earnest-Silveira L, Angus PW, Bock CT, Nachbur U, Silke J, Torresi J (2014) Hepatitis C virus-induced hepatocyte cell death and protection by inhibition of apoptosis. *J Gen Virol*, 95: 2204-2215.

Lok AS, Ghany MG, Goodman ZD, Wright EC, Everson GT, Sterling RK, Everhart JE, Lindsay KL, Bonkovsky HL, Di Bisceglie AM, Lee WM, Morgan TR, Dienstag JL, Morishima C (2005) Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort. *Hepatology*, 42: 282-292.

Lonovics J, Tulassay Z, Varró V. *Klinikai gastroenterológia*. Budapest, Medicina. 2003

Ma D, Tao X, Gao F, Fan C, Wu D (2012) miR-224 functions as an onco-miRNA in hepatocellular carcinoma cells by activating AKT signaling. *Oncology Letters*, 4: 483-488.

Maduli E, Andorno S, Rigamonti C, Capelli F, Morelli S, Colombi S, Nicosia G, Boldorini R, Abate M, Sartori M (2002) Evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C with a computer-assisted morphometric method. *Ann Ital Med Int*, 17: 242-247.

Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, Christensen RN, Schmidt WN, McCaffrey AP (2010) Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Laboratory Investigation*, 90: 1727-1736.

McCormick SE, Goodman ZD, Maydonovitch CL, Sjogren MH (1996) Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV RNA titer in patients with chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology*, 91: 1516-1522.

McMahon BJ (2005) Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis*, 25 Suppl 1: 3-8.

Mizuguchi Y, Takizawa T, Yoshida H, Uchida E (2016) Dysregulated miRNA in progression of hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Hepatol Res*, 46: 391-406.

Morita K, Taketomi A, Shirabe K, Umeda K, Kayashima H, Ninomiya M, Uchiyama H, Soejima Y, Maehara Y (2011) Clinical significance and potential of hepatic microRNA-122 expression in hepatitis C. *Liver International*, 31: 474-484.

Mormone E, George J, Nieto N (2011) Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chemico-Biological Interactions*, 193: 225-231.

Mortimer SA, Doudna JA (2013) Unconventional miR-122 binding stabilizes the HCV genome by forming a trimolecular RNA structure. *Nucleic Acids Research*, 41: 4230-4240.

Noetel A, Kwiecinski M, Elfimova N, Huang J, Odenthal M (2012) microRNA are central players in anti- and profibrotic gene regulation during liver fibrosis. *Frontiers in Physiology*, 3.

O'Brien MJ, Keating NM, Elderiny S, Cerda S, Keaveny AP, Afdhal NH, Nunes DP (2000) An assessment of digital image analysis to measure fibrosis in liver biopsy specimens of patients with chronic hepatitis C. *American Journal of Clinical Pathology*, 114: 712-718.

Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N (2012) MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut*, 61: 1600-1609.

Ohta T, Sakaguchi K, Fujiwara A, Fujioka S, Iwasaki Y, Makino Y, Araki Y, Shiratori Y (2006) Simple surrogate index of the fibrosis stage in chronic hepatitis C patients using platelet count and serum albumin level. *Acta Med Okayama*, 60: 77-84.

Osztrogonacz H, Stotz G, Horvath G, Tolvaj G, David K (2004) [Examination of hepatitis c virus antibody seropositive blood donors and their relatives]. *Orv Hetil*, 145: 1171-1175.

Par G, Horvath G, Par A (2013) [Non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis]. *Orv Hetil*, 154: 1124-1134.

Parola M, Robino G (2001) Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis. *J Hepatol*, 35: 297-306.

Patel K, Gordon SC, Jacobson I, Hezode C, Oh E, Smith KM, Pawlotsky JM, McHutchison JG (2004) Evaluation of a panel of non-invasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*, 41: 935-942.

Pilette C, Oberti F, Aube C, Rousselet MC, Bedossa P, Gallois Y, Rifflet H, Cales P (1999) Non-invasive diagnosis of esophageal varices in chronic liver diseases. *J Hepatol*, 31: 867-873.

Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Chappard D, Oberti F, Rifflet H, Maiga MY, Gallois Y, Cales P (1998) Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores - Comparison with serum markers. *Journal of Hepatology*, 28: 439-446.

Pohl A, Behling C, Oliver D, Kilani M, Monson P, Hassanein T (2001) Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol*, 96: 3142-3146.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P (1997) Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*, 349: 825-832.

Poynard T, McHutchison J, Manns M, Myers RP, Albrecht J (2003) Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology*, 38: 481-492.

Poynard T, Ngo Y, Perazzo H, Munteanu M, Lebray P, Moussalli J, Thabut D, Benhamou Y, Ratzu V (2011) Prognostic value of liver fibrosis biomarkers: a meta-analysis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 7: 445-454.

Ratzu V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G (2010) A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol*, 53: 372-384.

Reshetnyak VI (2015) Primary biliary cirrhosis: Clinical and laboratory criteria for its diagnosis. *World J Gastroenterol*, 21: 7683-7708.

Rossi E, Adams LA, Bulsara M, Jeffrey GP (2007) Assessing liver fibrosis with serum marker models. *Clin Biochem Rev*, 28: 3-10.

Sarasin-Filipowicz M (2010) Interferon therapy of hepatitis C: molecular insights into success and failure. *Swiss Med Wkly*, 140: 3-11.

Sasso M, Beaugrand M, de Ledinghen V, Douvin C, Marcellin P, Poupon R, Sandrin L, Miette V (2010) Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound Med Biol*, 36: 1825-1835.

Schaff Z, Gogl A, Dora R, Halasz T (2015) [The pathology of hepatitis C]. *Orv Hetil*, 156: 836-839.

Schaff Z, Seto B, Coleman WG, Jr., Lapis K (1986) Morphology and immunohistochemistry of experimental and human non-A, non-B hepatitis. *Tokai J Exp Clin Med*, 11 Suppl: 111-120.

Schaff Z, Tabor E, Jackson DR, Gerety RJ (1984) Ultrastructural alterations in serial liver biopsy specimens from chimpanzees experimentally infected with a human non-A, non-B hepatitis agent. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 45: 301-312.

Schulz PO, Ferreira FG, Nascimento Mde F, Vieira A, Ribeiro MA, David AI, Szutan LA (2015) Association of nonalcoholic fatty liver disease and liver cancer. *World J Gastroenterol*, 21: 913-918.

Scisciani C, Vossio S, Guerrieri F, Schinzari V, De Iaco R, de Meo PDO, Cervello M, Montalto G, Pollicino T, Raimondo G, Levrero M, Pediconi N (2012) Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NF kappa B inflammatory pathways. *Journal of Hepatology*, 56: 855-861.

Selaru FM, Olaru AV, Kan T, David S, Cheng Y, Mori Y, Yang J, Paun B, Jin Z, Agarwal R, Hamilton JP, Abraham J, Georgiades C, Alvarez H, Vivekanandan P, Yu W, Maitra A, Torbenson M, Thuluvath PJ, Gores GJ, LaRusso NF, Hruban R, Meltzer SJ (2009) MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Hepatology*, 49: 1595-1601.

Shenouda SK, Alahari SK (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*, 28: 369-378.

Shiffman ML, Diago M, Tran A, Pockros P, Reindollar R, Prati D, Rodriguez-Torres M, Lardelli P, Blotner S, Zeuzem S (2006) Chronic hepatitis C in patients with persistently normal alanine transaminase levels. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4: 645-652.

Sud A, Hui JM, Farrell GC, Bandara P, Kench JG, Fung C, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, McCaughan GW, George J (2004) Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology*, 39: 1239-1247.

Suzuki A, Angulo P, Lymp J, Li D, Satomura S, Lindor K (2005) Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, 25: 779-786.

Szabo E, Lotz G, Paska C, Kiss A, Schaff Z (2003) Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection. *Pathol Oncol Res*, 9: 215-221.

Szabo G, Bala S (2013) MicroRNAs in liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10: 542-552.

Szalay F (2013) [Hemochromatosis: one form of iron-overload diseases]. *Orv Hetil*, 154: 1156-1164.

Testa R, Testa E, Giannini E, Borro P, Milazzo S, Isola L, Ceppa P, Lantieri PB, Risso D (2006) Noninvasive ratio indexes to evaluate fibrosis staging in chronic hepatitis C: role of platelet count/spleen diameter ratio index. *J Intern Med*, 260: 142-150.

Torok NJ (2015) Update on Alcoholic Hepatitis. *Biomolecules*, 5: 2978-2986.

Tran A, Benzaken S, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Hastier P, Pradier C, Barjoan EM, Demuth N, Longo F, Rampal P (2000) Chondrex (YKL-40), a potential new serum fibrosis marker in patients with alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 12: 989-993.

Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, Fontaine H, Pol S (2007) FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*, 46: 32-36.

van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, Wedemeyer H, Dufour JF, Lammert F, Duarte-Rojo A, Heathcote EJ, Manns MP, Kuske L, Zeuzem S, Hofmann WP, de Knegt RJ, Hansen BE, Janssen HL (2012) Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *Jama*, 308: 2584-2593.

Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M (2008) MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 47: 1223-1232.

Venugopal SK, Jiang J, Kim TH, Li Y, Wang SS, Torok NJ, Wu J, Zern MA (2010) Liver fibrosis causes downregulation of miRNA-150 and miRNA-194 in hepatic stellate cells, and their overexpression causes decreased stellate cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298: G101-106.

Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok ASF (2003) A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38: 518-526.

Wang X, Chen J, Li F, Lin Y, Zhang X, Lv Z, Jiang J (2012) MiR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun*, 428: 525-531.

Wang Y, Hong Y, Li M, Long J, Zhao YP, Zhang JX, Li Q, You H, Tong WM, Jia JD, Huang J (2013) Mutation inactivation of Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma. *PLoS One*, 8: e82426.

Washington MK (2007) Autoimmune liver disease: overlap and outliers. *Mod Pathol*, 20 Suppl 1: S15-30.

Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM (2015) Hepatitis C. *Lancet*, 385: 1124-1135.

Wei J, Feng L, Li Z, Xu G, Fan X (2013) MicroRNA-21 activates hepatic stellate cells via PTEN/Akt signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67: 387-392.

Wright M, Thursz M, Pullen R, Thomas H, Goldin R (2003) Quantitative versus morphological assessment of liver fibrosis: semi-quantitative scores are more robust than digital image fibrosis area estimation. *Liver International*, 23: 28-34.

Wu J (2016) Utilization of animal models to investigate non-alcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*.

Xu J, Liu X, Gao B, Karin M, Tsukamoto H, Brenner D, Kisseleva T (2014) New Approaches for Studying Alcoholic Liver Disease. *Curr Pathobiol Rep*, 2: 171-183.

Yan-nan B, Zhao-yan Y, Li-xi L, jiang Y, Qing-jie X, Yong Z (2014) MicroRNA-21 accelerates hepatocyte proliferation in vitro via PI3K/Akt signaling by targeting PTEN. *Biochem Biophys Res Commun*, 443: 802-807.

Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, Ito S (1999) Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology*, 29: 719-727.

Yuan Q, Loya K, Rani B, Moebus S, Balakrishnan A, Lamle J, Cathomen T, Vogel A, Manns MP, Ott M, Cantz T, Sharma AD (2013) MicroRNA-221 overexpression accelerates hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology*, 57: 299-310.

Zaman A, Rosen HR, Ingram K, Corless CL, Oh E, Smith K (2007) Assessment of FIBROSpect II to detect hepatic fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Am J Med*, 120: 280.e289-214.

Zechini B, Pasquazzi C, Aceti A (2004) Correlation of serum aminotransferases with HCV RNA levels and histological findings in patients with chronic hepatitis C: the role of serum aspartate transaminase in the evaluation of disease progression. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 16: 891-896.

Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, Yoshima T, Ochi H, Chayama K (2013) Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 28: 565-575.

Ziol M, Kettaneh A, Ganne-Carrie N, Barget N, Tengher-Barna I, Beaugrand M (2009) Relationships between fibrosis amounts assessed by morphometry and liver stiffness measurements in chronic hepatitis or steatohepatitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 21: 1261-1268.

Internetről származó hivatkozások

<http://www.worldlifeexpectancy.com/cause-of-death/liver-disease/by-country/>

http://www.who.int/gho/countries/hun/country_profiles/en/.

http://www.who.int/gho/countries/hun/country_profiles/en/.

Life Science Sigma –Aldrich miRNA biogenesis: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/mirna/learning-center/mirna-introduction.html>

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke:

1. **Halász T**, Horváth G, Pár G, Werling K, Kiss A, Schaff Zs, Lendvai G.: miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan World Journal of Gastroenterology 2015 July 7; 21:(25)7814-7823
2. **Halász T**, Horváth G, Kiss A, Pár G, Szombati A, Gelley F, Nemes B, Kenessey I, Piurkó V, Schaff Z. Evaluation of Histological and non-Invazíve Methods for the Detection of Liver Fibrosis: The Values of Histological and Digital Morphometric Analysis, Liver Stiffness Measurement and APRI Score. Pathology Oncology Reasarchs. 2016 Jan; 22 (1):1-6

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Lendvai Gábor, Jármay Katalin, Karácsony Gizella, **Halász Tünde**, Kovalszky Ilona, Baghy Kornélia, Wittman Tibor, Schaff Zsuzsa, Kiss András: Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies World J Gastroenterol.2014 Nov 20;(41) 15343-15350
2. **Halász Tünde**, Farkas Anna, Tolvaj Gyula, Horváth Gábor: Pegylált interferonkezelés mellékhatása chronicus C-hepatitisben: agranulocytosis Orvosi Hetilap, 2007,147, 321-324
3. Horváth Gábor, Tolvaj Gyula, **Halász Tünde**, Stotz Gyula: A természetes interferon helye éslehetőségei a chronicus C-hepatitis kezelésében: a stopszabály miatt a kombinált antivirális terápiából kizárt betegek kezelésével szerzett tapasztalataink Orvosi. Hetilap 2007, 148, 1545-1550.
4. Horváth Gábor, Tolvaj Gyula, **Halász Tünde**, Stotz Gyula: The Role and the Possibilities of Natural Interferon Treatment for Chronic Hepatitis C: Our Experiences with Natural Interferon Treatment for Patients Debarred from

Combined Antiviral Therapy due to the STOP Rule HMJ (Hungarian Medical Journal) 2007, 1, 331-339.

5. Horváth Gábor, Tolvaj Gyula, **Halász Tünde**, Stotz Gyula: Normális szérumanin-aminotranszferáz-szintű, chronicus C hepatitisben szenvedő betegek kombinált antivirális kezelésével szerzett tapasztalataink. LAM 2007, 17, 777-781.
6. Schaff Zsuzsa, Gógl Alíz, Dóra Réka, **Halász Tünde**: A hepatitis C patológiája Orvosi Hetilap 2015;156, 836-839
7. Horváth Gábor, **Halász Tünde**, Makara Mihály, Hunyady Béla: Korszakváltás a chronicus C-vírus hepatitis terápiájában – új direkt ható antivirális szerek Orvosi Hetilap 2015;156, 841-848

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Mindenkinnek, aki a dolgozat elkészítésében segítségemre volt.

Mindenekelőtt Schaff Zsuzsa professzor asszonynak, aki programvezetőként és konzulensként lehetővé tette a munka létrejöttét, támogatott, segített a felmerülő problémák megoldásában

Tímár József professzor úrnak is köszönöm, hogy intézetvezetőként lehetővé tette a kutató munkát számomra.

Köszönetemet fejezem ki Lendvai Gábornak, a molekuláris vizsgálatok elvégzésében, kiértékelésében nyújtott segítségéért és a cikkek megírásában adott tanácsaiért.

Törzsök Péternek és Fintha Attilának a digitális morphometriai analysis során nyújtott segítségükért, Kenessey Istvánnak a statisztikai módszerekben és elemzésben nyújtott segítségéért.

Köszönet az intézeti asszisztenseknek és különösen Piurkó Violetának a speciális festések elvégzéséért, Rigóné Káló Elvirának is köszönöm az angol nyelvű közlemények korrekcióját.

Köszönöm Pál Gabriellának a képek elkészítésében és dolgozat formai elkészítésében nyújtott segítségét.

Végül szeretném megköszönni családomnak, férjemnek, Horváth Gábornak és gyermekeimnek Leventének és Csillának a türelmet és támogatást munkám elkészítéséhez.